

THESE

présentée à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE (Doctorat d'Etat)
par **Marie-Madeleine GALTEAU**

Pharmacien

Assistant à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nancy
et au Centre de Médecine Préventive de Vandœuvre-lès-Nancy
Titulaire du D.E.A. de Biochimie Appliquée
et des Certificats d'Etudes Spéciales de Biochimie Pharmaceutique et Technique
et d'Immunologie Générale et Appliquée
née le 20 juillet 1943 à Reims

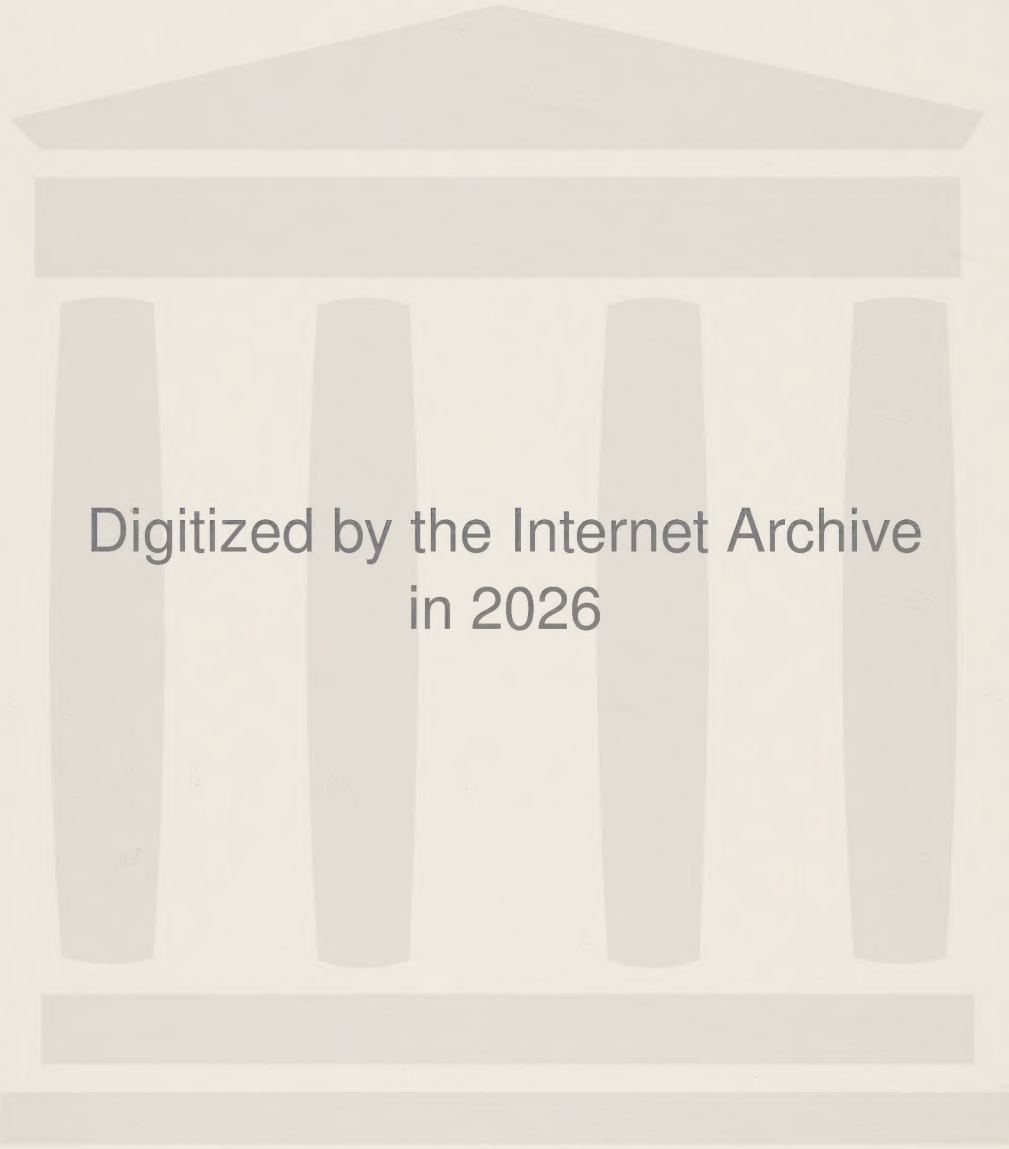
SUJET

**ETUDE DU PHENOMENE DE SORTIE D'ENZYMES MUSCULAIRES
RELATIONS AVEC LES VARIATIONS DES METABOLITES ET
DES ENZYMES AU COURS DE L'EXERCICE**

SOUTENUE LE 6 OCTOBRE 1973, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Examineurs de la Thèse

Président : M. le Professeur **PIERFITTE** (Nancy)
Juges : M. le Professeur **BOURA** (Nancy)
M. le Professeur **SIEST** (Nancy)
M. le Professeur **POORTMANS** (Bruxelles)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555415_0001

THESE

présentée à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE (Doctorat d'Etat)
par **Marie-Madeleine GALTEAU**

Pharmacien

Assistant à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nancy
et au Centre de Médecine Préventive de Vandœuvre-lès-Nancy
Titulaire du D.E.A. de Biochimie Appliquée
et des Certificats d'Etudes Spéciales de Biochimie Pharmaceutique et Technique
et d'Immunologie Générale et Appliquée
née le 20 juillet 1943 à Reims

SUJET

**ETUDE DU PHENOMENE DE SORTIE D'ENZYMES MUSCULAIRES
RELATIONS AVEC LES VARIATIONS DES METABOLITES ET
DES ENZYMES AU COURS DE L'EXERCICE**

SOUTENUE LE 6 OCTOBRE 1973, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Examineurs de la Thèse

Président : M. le Professeur **PIERFITTE** (Nancy)
Juges : M. le Professeur **BOURA** (Nancy)
M. le Professeur **SIEST** (Nancy)
M. le Professeur **POORTMANS** (Bruxelles)

THÈSE

présentée à l'Université de Nancy I, des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE (Docteur d'Etat)
par Michel-Mathieu GALTÉAU

Thèse présentée à l'Université de Nancy I, des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, le 15 octobre 1981, pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Docteur d'Etat).
Le Président de la Commission d'Examen est M. le Professeur MERITTE (Nancy).
Les Membres de la Commission d'Examen sont : M. le Professeur BOURA (Nancy), M. le Professeur SIEST (Nancy), M. le Professeur POORTMANE (Nancy).
Le Directeur de Thèse est M. le Professeur MERITTE (Nancy).
Le Jury est composé de : M. le Professeur MERITTE (Nancy), M. le Professeur BOURA (Nancy), M. le Professeur SIEST (Nancy), M. le Professeur POORTMANE (Nancy).

SUJET

ETUDE DU PHÉNOMÈNE DE SORTIE D'ENZYMES MUSCULAIRES
RELATIONS AVEC LES VARIATIONS DES MÉTABOLITES ET
DES ENZYMES AU COURS DE L'EXERCICE



SOUTENUE LE 5 OCTOBRE 1981 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Examinateur de la Thèse

Président : M. le Professeur MERITTE (Nancy)
M. le Professeur BOURA (Nancy)
M. le Professeur SIEST (Nancy)
M. le Professeur POORTMANE (Nancy)

UNIVERSITE DE NANCY I

U.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
ET BIOLOGIQUES

ADMINISTRATION

DIRECTEUR

Professeur R. BENE

SECRETAIRE PRINCIPAL

M. MASSON

ENSEIGNEMENT

DOYENS HONORAIRES

MM. RICHARD G.
BERNANOSE A.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. CORDEBARD H.
FRANQUET R.
STEIMETZ E.

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M. ANZIANI P.
Mme LASSEUR A.

PROFESSEURS

M. MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Mlle FRANCOIS M.Th.	Matière médicale
MM. MARCHAL J.G.	Microbiologie
SOLEIL J.	Pharmacie Chimique
BERNANOSE A.	Physique
Mlle BESSON S.	Pharmacodynamie
MM. BENE R.	Sciences biologiques
MIRJOLET M.	Chimie analytique et toxicologie
PIERFITTE M.	Chimie biologique
MARTIN J.A.	Chimie minérale et minéralogie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mlle GIRARD Th.	Hygiène
MM. HAYON J. Cl.	Matière médicale et botanique
SCHWARTZBROD L.	Microbiologie
SIEST G.	Chimie biologique
MM. BONALY R.	Chimie biologique
LEMAY R.	Législation et déontologie pharmaceutique
LOPPINET V.	Chimie organique
VIGNERON C.	Sciences biologiques appliquées à la pharmacie

MAITRES DE CONFERENCES DELEGUES

MM. BAUDOT Ph.	Toxicologie
BOYER P.	Physique
LECTARD P.	Biologie Végétale et Cryptogamie

MAITRES-ASSISTANTS

M. MONAL	Sciences pharmaceutiques
Mme BALDO	Microbiologie
M. HOFFMAN	Pharmacie galénique
M. JACQUE	Pharmacodynamie
Mme HOFFMAN	Pharmacie galénique
Mlle PANEK	Chimie biologique
Mme SCHWARTZBROD	Microbiologie

AVANT PROPOS

Nous tenons tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur PIERFITTE d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse et Monsieur le Professeur BOURA qui a bien voulu juger ce travail.

Nous remercions tout particulièrement Monsieur le Professeur SIEST qui, dès la fin de notre scolarité, nous a initiés à la recherche et nous a aidés de ses conseils précieux. Son dynamisme a été notre meilleur stimulant.

Monsieur le Professeur POORTMANS nous a accueillis dans son laboratoire. Son expérience nous a été d'un grand secours et nous l'en remercions vivement.

Nous n'aurions garde d'oublier l'enseignement de tous nos maîtres de la Faculté de Pharmacie.

Ce travail a été réalisé avec les collaborations techniques successives de Mesdames Danièle GRANDVAUX, Hélène FRANCOIS et Eliane VIEL. Nous avons apprécié leurs qualités de techniciennes, l'intérêt qu'elles ont manifesté au cours de sa réalisation. Nous les en remercions vivement.

Nous tenons enfin à exprimer notre gratitude à tous ceux qui nous ont apporté leur soutien, en particulier aux secrétaires des laboratoires du Centre de Médecine Préventive et de Techniques Biochimiques Spéciales.

A TOUS LES MIENS

Nous tenons à remercier pour leur aide et leurs conseils

Monsieur le Professeur GRIGNON et Monsieur GUEDENET
(Service de Microscopie Electronique, UER des Sciences
Biologiques - Nancy)

Ce travail a été effectué

- au laboratoire de Biochimie, 7 rue Albert Lebrun 54000 NANCY
(Directeur Monsieur le Professeur G.SIEST)
- au Centre de Médecine Préventive, 2 avenue du Doyen Jacques Parisot
54500 VANDOEUVRE LES NANCY (Dir. Monsieur le Professeur R.SENAUULT)
- et au laboratoire de l'Effort, Institut Supérieur d'Education Physique,
Université libre de Bruxelles, Avenue Paul Heger, BRUXELLES (Dir.
Monsieur le Professeur M.SEGERS)

ABREVIATIONS UTILISEES

Certaines sont communément admises en biochimie
D'autres sont plus spécifiques du sujet traité.

ADP	Adénosine 5' diphosphate	
ALD	Fructose diphosphate aldolase	EC 4.1.2.13
AMP	Adénosine monophosphate	
ATP	Adénosine 5' triphosphate	
CPK	Créatine phosphokinase	EC 2.7.3.2.
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique	
GLDH	Glutamate déshydrogénase	EC 1.4.1.2.
GOT	Aspartate aminotransférase	EC 2.6.1.1.
GPT	Alanine aminotransférase	EC 2.6.1.2.
LDH	Lactate deshydrogénase	EC 1.1.1.27
MDH	Malate déshydrogénase	EC 1.1.1.37
OCT	Ornithine carbamyl transférase	EC 2.1.3.3.
PA	Phosphatase alcaline	EC 3.1.3.1.
PEP	Phosphoénolpyruvate	
PK	Pyruvate kinase	EC 2.7.1.40
SDH	Succinate déshydrogénase	EC 1.3.99.1
$\bar{m}$	Moyenne	
C.V.	Coefficient de variation	
s	Ecart type	

----- INTRODUCTION -----

L'évolution de la biologie appliquée à l'homme sain ou malade suppose d'une part une refonte de l'utilisation et de la prescription des examens de laboratoire par les cliniciens, d'autre part une recherche des examens nouveaux. Les variations biochimiques les plus précoces et les plus fines ne peuvent être appréciées qu'à l'échelon cellulaire par des méthodes chimiques et histologiques. Ceci est encore plus vrai et plus nécessaire pour définir toute déviation légère de l'état de santé. Une prévention établie sur des bases scientifiques l'exige. C'est dans cet esprit qu' a été entrepris ce travail consacré essentiellement aux variations des enzymes plasmatiques dues à l'exercice et à des études expérimentales susceptibles d'expliquer le mécanisme des variations observées.

Les techniques de mesure des enzymes sont délicates et l'on connaît peu de choses sur l'origine et le catabolisme de ces protéines normalement présentes dans le plasma. De plus dans chaque organe, dans chaque cellule, on trouve des activités enzymatiques souvent fort semblables, bien que dues à des protéines différentes. On admet avec SCHMIDT que les enzymes habituellement présentes dans le plasma proviennent en majorité du tissu musculaire, du foie et de l'intestin. En effet, la masse de ces organes et leur teneur en protéines indiquent que ces organes doivent prédominer. Cependant les muscles dont les enzymes à demi-vie longue, ne peuvent contribuer qu'en partie aux enzymes habituelles du plasma, sont en réalité le réservoir le plus important par leur masse (35 %) et leur teneur en protéines (19 %).

Les enzymes peuvent augmenter ou diminuer dans les cellules. Comment le démontrer sans faire de ponction biopsie ? L'exercice pouvait être un moyen de provoquer "une agression" à l'échelon cellulaire, d'effectuer donc une exploration fonctionnelle. Une épreuve d'effort provoque une libération de certaines enzymes tissulaires que l'on retrouve dans le compartiment plasmatique. La première partie de notre travail décrit les résultats obtenus avec un effort modéré tel qu'il est pratiqué au Centre de Médecine Préventive de Vandoeuvre. En dehors des enzymes, la plupart des paramètres biologiques courants ont été mesurés également car il est important de préciser l'effet d'une telle variable physiologique dans le cadre de nos études sur les valeurs de référence. Il faut en effet connaître le sens et le degré des variations entraînées par un exercice modéré ou par l'entraînement afin de pouvoir en tenir compte dans l'interprétation fine des examens biologiques. L'effort est aussi un moyen de prévention (1) ou de détection de certaines maladies (2, 3,4).

Mais il ne suffit pas de constater des variations, il est également nécessaire d'expliquer l'origine de ces fluctuations. La complexité des mécanismes de régulation chez l'homme nous a obligés à faire une première approche in vitro sur des tissus et des cellules musculaires de rat. Ces essais font l'objet de la deuxième partie de notre travail.

La cellule a été longtemps considérée comme un "sac d'enzymes" mais depuis les études concernant les organites subcellulaires, les liaisons intra-cellulaires..., cette conception ne suffit plus. Il faut y ajouter la notion de structure organisée, dans laquelle les enzymes occupent des postes déterminés et importants. En général, les enzymes ne sont pas libres dans la cellule mais liées plus ou moins fortement à d'autres protéines, ou à des structures membranaires. Une très grande partie (40 à 90 %) des masses cellulaires sont d'origine membranaire. Toute modification subie par la cellule implique une "lésion membranaire" plus ou moins grave.

Nous avons étudié les liaisons protéine-protéine en premier lieu par des techniques d'extraction, de "solubilisation ou décrochement" d'enzymes, puis nous avons fait ensuite appel à des méthodes plus fines, plus proches des conditions physiologiques. Nous avons recherché, à l'aide de fibres musculaires dissociées ou de muscles entiers isolés maintenus en survie, les effets de différents substrats, métabolites sur la sortie des enzymes. Nous avons également utilisé certains détergents ou des médicaments pour leurs effets connus sur les membranes.

----- PREMIERE PARTIE -----

CHAPITRE I

VARIATIONS DE PARAMETRES PLASMATIQUES APRES UN EFFORT STANDARDISE CHEZ LE SUJET NON ENTRAINE ET SUPPOSE SAIN

Un effort intense entraîne chez l'homme et chez l'animal un certain nombre de modifications morphologiques (perte de poids...), physiologiques (accélération du rythme cardiaque...), ou métaboliques (augmentation du taux de lactate sanguin, variations des enzymes plasmatiques...). Par contre, les modifications dues à l'activité physique normale ou à un effort limité sont très peu connues.

Le Centre de Médecine Préventive de Vandoeuvre-lès-Nancy est un centre expérimental où s'effectuent des bilans de santé familiaux pour la population lorraine. Les sujets bénéficiant de ce bilan sont soumis à des examens morphologiques, radiologiques, psychosensoriels, biochimiques... Ils doivent, de plus, répondre à des questionnaires concernant leur mode de vie, leurs loisirs, leur alimentation, etc...

En dehors de ces examens statiques effectués sur chaque sujet, des tests d'exploration fonctionnelle sont pratiqués. C'est ainsi que nous avons été amenés à étudier les variations de certains paramètres plasmatiques après un effort modéré bien supporté par tous. Ces études ont été menées sur des groupes de sujets restreints, non entraînés, des deux sexes et d'âges divers.

Nous présentons les résultats obtenus pour un certain nombre d'électrolytes et de métabolites présents dans le plasma. La réponse à l'effort a également été examinée en fonction du sexe, de l'âge, de l'activité socio-professionnelle des sujets, et de leur poids ou plutôt de leur surcharge pondérale éventuelle .

1.1. MATERIEL ET METHODES

1.1.1. DEFINITION DE LA POPULATION

Des sujets supposés sains choisis au hasard parmi la population lorraine, bénéficiant d'un bilan de santé au Centre de Médecine Préventive de Vandoeuvre-lès-Nancy, sont soumis à un effort standardisé selon le protocole décrit ci-après.

La population est divisée par sexe, en trois classes d'âge (tableau I).

TABEAU I : REPARTITION SELON L'AGE ET LE SEXE DES PERSONNES SOUMISES A L'EPREUVE STANDARDISEE D'EFFORT

	20 - 30 ANS	30 - 40 ANS	40 - 50 ANS
HOMMES	118	47	88
FEMMES	34	48	28

L'effort mettant en jeu une masse musculaire importante, celle-ci joue un rôle prépondérant dans la réponse à l'exercice. Il est actuellement impossible de mesurer systématiquement la masse musculaire surtout dans nos

conditions de travail. Nous avons donc tenté de l'approcher en utilisant le poids des sujets ou mieux, le poids idéal selon LORENTZ calculé suivant les formules simplifiées dans lesquelles T représente la taille

$$- \text{Hommes} : 50 + 0,75 (T - 150)$$

$$- \text{Femmes} : 45 + 0,75 (T - 150)$$

La figure 1 présente les répartitions du poids et du poids idéal des sujets obtenues pour chaque groupe.

Il y a un décalage entre poids réel et poids idéal. Il est connu que le poids idéal selon LORENTZ ne conduit pas à une évaluation de la masse musculaire. Il permet seulement de séparer les individus en "gros", "maigres" et "normaux".

1.1.2. DEFINITION DE L'EPREUVE D'EFFORT

Les sujets à jeun sont soumis à un effort de 12 minutes sur cyclo-ergomètre. Cet effort est standardisé au maximum. Il est pratiqué en trois paliers de 4 minutes à 25, 50 et 75 W pour les hommes et 25, 37,5 et 62,5 W pour les femmes.

Au cours de cet exercice, différents paramètres physiologiques sont surveillés, en particulier la fréquence cardiaque. Un électrocardiogramme permet de s'assurer que le sujet supporte bien l'épreuve.

1.1.3. PRELEVEMENTS

Deux prélèvements sanguins sont effectués au pli du coude, l'un avant effort (entre 8 heures 30 et 9 heures 15), l'autre dans le courant de la matinée, dans les trois minutes suivant la fin de l'épreuve. Le sang recueilli sur héparinate de lithium est centrifugé immédiatement et le plasma est analysé.

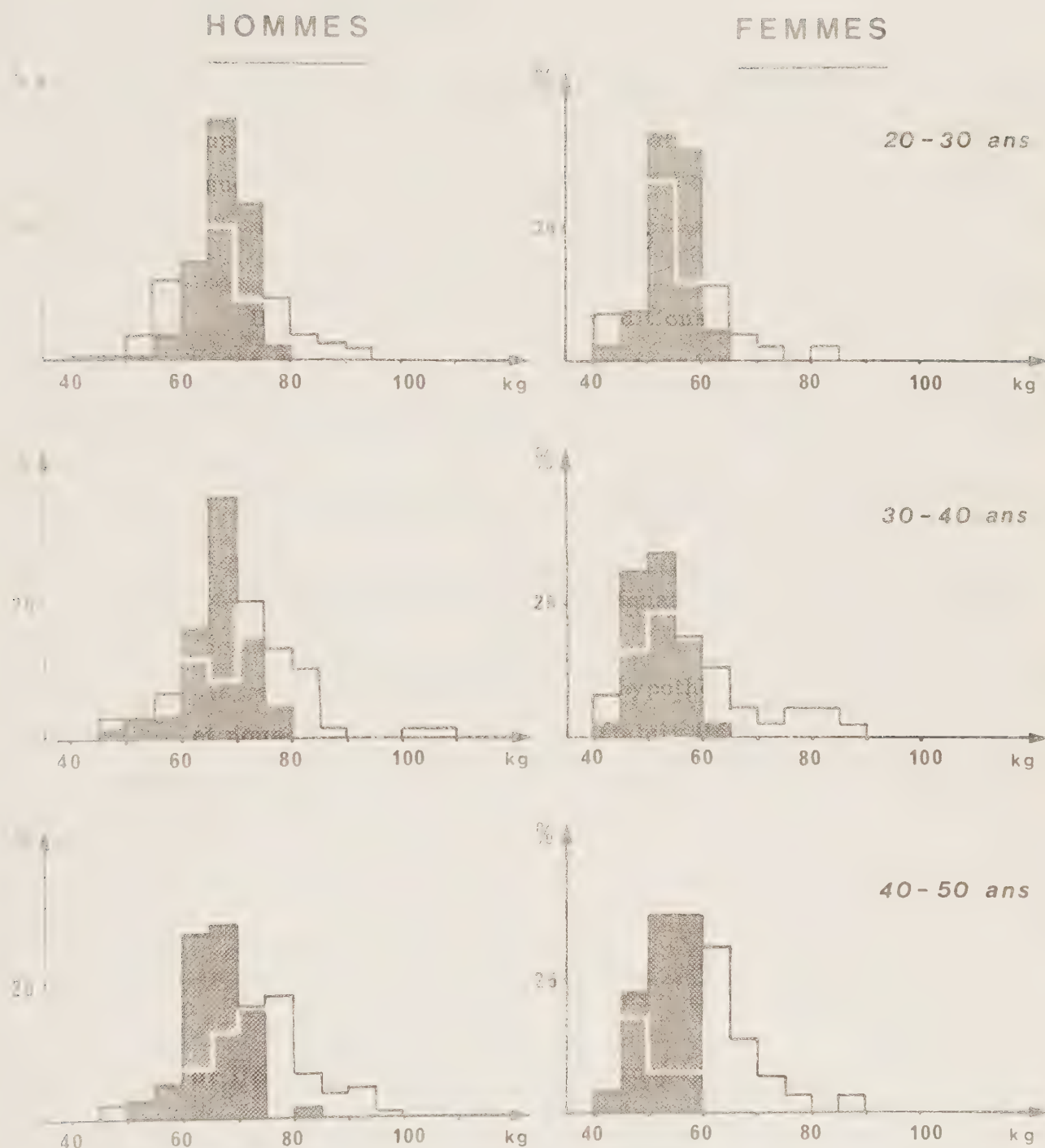


Figure 1 : Histogrammes de répartition du poids mesuré (colonnes blanches) et du poids idéal selon LORENTZ (colonnes grises) de la population étudiée en fonction du sexe et de l'âge.

1.1.4. METHODES ANALYTIQUES

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un autoanalyseur séquentiel SMA 12/60 Technicon, selon les méthodologies recommandées par le constructeur (Tableau II).

Le sodium et le potassium sont dosés par photométrie de flamme.

Les résultats sont exprimés en unités classiques et, selon les recommandations internationales, en unités nouvelles (5).

Un contrôle de qualité très strict permet de s'assurer de la valeur des résultats.

. La reproductibilité sur un jour a été calculée sur 40 échantillons d'un pool de plasmas. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau II

. Plusieurs mesures d'un sérum-témoin sont effectuées avec chaque série de prélèvements. Un programme informatique traite ces résultats (15).

. De même, pour chaque donnée biologique, la moyenne des valeurs obtenues pour 36 patients est calculée quotidiennement (16). Elle permet de contrôler l'ensemble des manipulations depuis le prélèvement.

. Un contrôle supplémentaire est effectué en dosant par des méthodes manuelles quelques échantillons pris au hasard dans la série.

. Enfin, pour éviter au maximum les phénomènes de dérive et de contamination, les échantillons prélevés avant et après effort sont analysés l'un derrière l'autre.

1.2. RESULTATS ET DISCUSSION

1.2.1. RESULTATS GLOBAUX

Pour chaque paramètre, afin de connaître l'ampleur et le sens des modifications dues à l'exercice, nous avons calculé les pourcentages de variations de la moyenne après effort par rapport à la moyenne avant effort. Ces pourcentages sont accompagnés d'un signe (+) lorsqu'il s'est produit une augmentation après effort et d'un signe (-) lorsqu'on observe une diminution.

Nous avons comparé les moyennes obtenues avant et après effort grâce à un test de STUDENT (17).

TABEAU II : METHODES DE DOSAGE ET REPRODUCTIBILITE SUR UN JOUR
(moyennes, écarts-type et coefficients de variation)

° SMA 12/60 Technicon

	Anciennes unités				Nouvelles unités		
		m	s	C.V. %		m	s
Calcium total ° (6) (Complexon crésol phtaléine)	mg/l	100,1	0,78	0,90	mmol/l	1,50	0,02
Phosphore ° (Molybdate d'ammonium chlorure stanneux) (7)	mg/l	33,3	0,49	1,47	mmol/l	1,07	0,02
Protéines totales ° (Biuret)	g/l	79,7	0,63	0,79	g/l	—	—
Albumine ° (8) (Acide 2 (4'hydroxyazobenzène benzoïque)	g/l	43,6	0,63	1,44	µmol/l	631,9	9,13
Glucose ° (Néocuproïne) (9)	g/l	1,00	0,02	2,00	mmol/l	5,56	0,11
Cholestérol total ° (10) (Anhydride acétique, acide sulfurique)	g/l	2,46	0,06	2,44	mmol/l	6,36	0,16
Urée ° (11) (Diacetyl monoxime)	g/l	0,32	0,005	1,70	mmol/l	5,32	0,083
Créatinine ° (12) (Acide picrique)	mg/l	8,6	0,34	3,96	µmol/l	76,11	3,01
Acide urique ° (13) (Acide phosphotungstique tungstate de sodium)	mg/l	54,6	0,44	0,80	µmol/l	325,0	2,62
Bilirubine totale ° (14) (Acide sulfanilique, nitrite de sodium)	mg/l	5,0	0,22	4,40	µmol/l	8,55	0,38
Sodium (Photomètre de flamme)	mEq/l	138,7	0,40	0,29	mmol/l	138,7	0,40
Potassium (Photomètre de flamme)	mEq/l	4,20	0,04	0,95	mmol/l	4,20	0,04

Les histogrammes de répartition sont rarement gaussiens. C'est pourquoi il aurait fallu utiliser les valeurs médianes et non les moyennes pour ces calculs. Cependant nous avons vérifié sur quelques paramètres que les variations dues à l'effort entraînent un glissement des histogrammes sans en changer la forme.

Nous examinerons successivement les variations obtenues pour les électrolytes et les protéines, pour les substrats et pour les produits du catabolisme.

1.2.1.1. Electrolytes et protéines

TABEAU III : VARIATIONS DES ELECTROLYTES ET DES PROTEINES SOUS L'INFLUENCE D'UN EXERCICE MODERE : EFFET DU SEXE ET DE L'AGE

(Résultats exprimés en pourcentages de variations

Degrés de signification :

•••• $p < 0,001$

•• $p < 0,01$

• $p < 0,05$)

	HOMMES			FEMMES		
	20-30 ANS	30-40 ANS	40-50 ANS	20-30 ANS	30-40 ANS	40-50 ANS
Calcium total	••• + 0,73	• + 0,88	• + 0,68	• + 1,01	• + 1,24	• + 1,44
Phosphore	••• + 6,25	••• + 7,33	••• + 9,40	• + 6,17	••• + 5,86	••• + 7,36
Sodium	• - 0,91	+ 0,08	•• - 0,47	+ 0,19	+ 0,04	• + 0,41
Potassium	- 1,17	- 1,43	+ 0,13	+ 0,22	+ 1,17	+ 0,97
Protéines totales	••• + 2,23	••• + 2,71	••• + 1,32	• + 2,57	••• + 2,40	••• + 3,16
Albumine	••• + 2,70	••• + 4,10	••• + 1,96	• + 2,90	• + 1,94	•• + 3,19

Pour certains paramètres (calcium, phosphore, protéines, albumine,) les variations sont toujours significatives avec un risque d'erreur de 5 %, au maximum.

Calcium total

Nous observons une élévation significative du taux du calcium plasmatique, quel que soit le groupe examiné. Les variations semblent un peu plus importantes chez les femmes (de l'ordre de 1,20 %) que chez les hommes (environ 0,76 %). Cependant ces différences ne sont pas significatives, ce qui confirme les résultats de DE LANNE et coll. (18). D'après ROUGIER et coll. (19), le calcium est un des électrolytes les plus stables à l'effort. Cependant, une tendance à l'augmentation se manifeste dans les exercices modérés et brefs alors que les efforts épuisants se traduisent par une baisse légère. Le calcium, essentiellement ionisé, serait capté transitoirement par la fibre musculaire entraînant une baisse du calcium ionisé sérique (19). Enfin, les parathyroïdes pourraient jouer un rôle (20) en libérant leur hormone.

Phosphates

Comme le calcium, le phosphore plasmatique est augmenté dans toutes les tranches d'âge, parfois de façon importante. En effet, la variation atteint 9,40 % chez les hommes de 40 à 50 ans. Ces résultats sont conformes à ceux trouvés par DE LANNE et coll. (18) et PRUETT (21). ROUGIER et BABIN (19) notent aussi une hyperphosphorémie quelle que soit la durée de l'effort, en fonction de son intensité. Ces variations ne sont pas surprenantes si l'on se réfère à l'importance des phosphates dans les phénomènes énergétiques.

Sodium

Le sodium est un cation très stable. Même pendant un effort, ses variations sont de faible amplitude et restent de l'ordre de la reproductibilité de la méthode (19). Les auteurs ne sont pas d'accord quant au sens de la variation, certains penchent pour une hyponatrémie, d'autres pour une hypernatrémie d'effort. Dans notre étude, les hommes de 20 à 30 ans et de 40 à 50 ans montrent une diminution significative du taux de sodium alors que dans les autres classes, il se produit une augmentation qui n'est significative que chez les femmes de 40 à 50 ans. Il est à noter que la variation de 143,9 mEq/l à 145,0 mEq/l obtenue par METIVIER (22) correspond à une augmentation de 0,76 % de la natrémie, élévation du même ordre que celle que nous avons pu constater. DE LANNE et coll. (18) quant à eux, trouvent une variation significative par rapport au taux de repos. Cependant, leurs résultats ne semblent pas corroborer cette affirmation, du moins chez l'homme où la natrémie reste à 142 mEq/l. Chez la femme, elle passe de 140 (+ 1,0) à

142 (+ 1,2) mEq/l. Après des calculs de correction dus à la diminution du volume plasmatique, Van BEAUMONT et coll. (23) obtiennent une diminution significative du sodium après un effort violent et bref.

Les variations du sodium sont liées à celles de l'eau donc à l'hémoconcentration possible au cours d'un effort. Compte-tenu des divergences d'opinion concernant les phénomènes d'hémoconcentration, l'interprétation des variations de la natrémie est très difficile. Ces changements sont quantitativement peu importants et n'intéressent qu'un pourcentage très faible du sodium plasmatique.

Potassium

Pour les sujets que nous avons testés, il apparaît des variations contradictoires de la kaliémie. Quel que soit le sens de variation, elle est de faible amplitude. Pourtant, DE LANNE et coll. (18) indiquent une augmentation rapide et très précoce dans les deux sexes. CANTONE et CERRETELLI (24) trouvent une variation importante (4,8 à 5,6 mEq/l) chez des sujets non entraînés, soumis à un effort intense. PRUETT (21) obtient aussi une augmentation précoce et la valeur de cette élévation semble dépendre de la sévérité de la charge de travail. Les étudiants non entraînés, testés par ALBANESE et coll. (25), montrent une augmentation de 1,0 mEq de potassium par litre de plasma.

L'effort semble donc se traduire par une hyperkaliémie qui est fonction de l'intensité. L'exercice pratiqué par nos sujets est peu intense et paraît insuffisant à provoquer des variations marquées. De plus, les mouvements du potassium sont très rapides (23) et complexes, se traduisent par des modifications variables selon le moment précis du prélèvement (19). En moins d'une minute après la fin de l'épreuve, le potassium veineux est revenu à sa valeur de repos (26). L'hyperkaliémie, fréquente dans les exercices brefs n'apparaît plus dans les efforts longs. Elle paraît n'être qu'un temps intermédiaire préparatoire à l'hypokaliémie qui se manifeste après un travail prolongé (19).

Protéines totales

Les protéines totales sont augmentées significativement dans toutes les tranches d'âge. L'élévation atteint sa valeur maximum chez les femmes de 40 à 50 ans. Elle est alors de 3,16 %.

Plusieurs auteurs (18, 24, 27, 28, 29, 30) ont rapporté une augmentation des protéines plasmatiques après un effort, en général important. DELFORGE et coll. (31) ont mis en évidence qu'à la suite d'un exercice modéré, les protéines restaient stables alors qu'elles étaient multipliées par un facteur de 1,1 lors d'une épreuve plus longue et plus intense. Il se produit donc une augmentation des protéines plasmatiques. Ceci peut être le fait d'un accroissement de la perméabilité membranaire, entraînant une hémoconcentration, ou dû à une augmentation de la synthèse protéique.

Certains auteurs ont pu montrer que ces augmentations étaient le résultat d'une synthèse de protéines mitochondriales (33). Cette hypothèse, valable pour l'entraînement et l'effort exhaustif, ne peut être maintenue dans une épreuve du type de celle que nous avons fait pratiquer. Certains chercheurs ont d'ailleurs montré que le métabolisme protéique n'était pas modifié par une activité musculaire ordinaire (25). Les phénomènes d'hémoconcentration indéniables, au cours d'efforts épuisants, en semblent pas pouvoir être invoqués ici. Van BEAUMONT et coll. (23) prétendent que l'augmentation des protéines est le résultat d'une perte importante de fluides au cours de l'effort et qu'en fait le niveau des protéines diminue après un exercice bref et intense.

Enfin, la technique de prélèvement est importante. En effet, la pose d'un garrot, entraînant une stase sanguine se traduit par une augmentation des protéines. La position du corps au moment du prélèvement produit aussi des modifications des taux de protéines (34).

Albumine

Les variations de l'albumine sont, en général, parallèles à celles des protéines. Nous observons des augmentations significatives dans tous les cas. L'ampleur de la variation est du même ordre que celle trouvée par POORTMANS (28, 29). A la suite d'un effort même modéré, il se produit donc une augmentation significative du calcium, du phosphore et des protéines.

1.2.1.2. Substrats

Le tableau IV regroupe les variations du glucose et du cholestérol total.

TABLEAU IV : VARIATIONS DUES A L'EFFORT DU GLUCOSE ET DU CHOLESTEROL TOTAL.
INFLUENCE DU SEXE ET DE L'AGE
(Résultats exprimés en pourcentages de variation
Degrés de signification : *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ • $p < 0,05$)

	HOMMES			FEMMES		
	20-30 ans	30-40 ans	40-50 ans	20-30 ans	30-40 ans	40-50 ans
Glucose	*** - 2,37	*** - 5,34	*** - 3,97	** - 5,81	*** - 5,45	** - 3,68
cholestérol total	• + 1,86	+ 2,01	+ 1,78	+ 1,46	+ 1,90	+ 1,18

1.2.1.3. Produits du catabolisme

Nous examinerons les variations de l'urée, de la créatinine, de l'acide urique et de la bilirubine totale.

TABLEAU V : VARIATIONS DUES A L'EFFORT DE L'UREE, LA CREATININE, L'ACIDE URIQUE ET LA BILIRUBINE TOTALE. EFFET DU SEXE ET DE L'AGE.

(Résultats exprimés en pourcentages de variation

Degrés de signification : *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

	HOMMES			FEMMES		
	20-30 ans	30-40 ans	40-50 ans	20-30 ans	30-40 ans	40-50 ans
Urée	*** - 3,55	*** - 2,94	** - 1,64	* - 5,59	*** - 3,76	*** - 3,22
Créatinine	- 0,08	+ 2,70	** + 3,09	+ 1,19	** + 3,67	** + 4,33
Acide urique	+ 0,06	+ 0,35	+ 0,29	+ 0,72	- 0,12	- 0,31
Bilirubine totale	*** + 6,78	+ 4,20	*** + 5,11	+ 2,02	- 2,74	+ 3,20

Urée

Nous obtenons une diminution significative alors que la majorité des auteurs (51, 52, 53, 54) trouvent une augmentation de ce paramètre biologique. Cependant, l'effort appliqué est beaucoup moins intense que les épreuves imposées par ces chercheurs. De plus, les travaux sont, en général, effectués chez l'animal pour lequel la réponse peut différer de celle de l'homme.

Créatinine

Nous obtenons des résultats peu significatifs, pour ce paramètre biologique. Il se produit des variations allant jusqu'à 3,67 % chez les femmes de 30 à 40 ans, mais ces variations ne se retrouvent pas dans toutes les tranches d'âge. Il y a cependant une tendance à l'augmentation. HALLAUER et coll. (55) ont trouvé, au cours d'un exercice maximal, une augmentation significative. Cette élévation serait due, non seulement à la diminution de la clearance de la créatinine (56), mais aussi à la mobilisation de la créatinine par les muscles au travail.

Acide urique

Il présente des modifications très faibles, parfois de sens différents, du moins, dans notre étude. SCHMIDT et coll. (57) ont trouvé une augmentation systématique de l'acide urique chez des sujets soumis à une course de 400 m, 1 000 m et un marathon, épreuves beaucoup plus importantes que les nôtres. D'après ces auteurs, l'augmentation de l'acide urique peut être le fait d'un accroissement de la synthèse ou de la diminution de la clearance rénale sous l'influence de la production de lactate ou de corps cétoniques.

Bilirubine totale

Nous observons, en général, une augmentation, sauf chez les femmes de 30 à 40 ans pour lesquelles il se produit une diminution. Ces variations ne sont significatives que chez les hommes de 20 à 30 ans et de 40 à 50 ans et restent de l'ordre de la reproductibilité du dosage. Aucune explication de ces fluctuations n'a pu être trouvée dans la littérature.

Ces résultats globaux montrent donc un certain nombre de variations significatives, bien que l'effort effectué ici, il convient de ne pas l'oublier, soit très modéré.

1.2.2. VARIATIONS INTER ET INTRAINDIVIDUELLES DE LA REPONSE A L'EFFORT

Nous avons examiné l'importance des facteurs de variations inter et intraindividuelles comme le sexe, l'âge, la catégorie socioprofessionnelle et le poids. A notre connaissance, cette approche n'a jamais été effectuée.

1.2.2.1. Influence du sexe

Il est bien connu maintenant que, au repos, le niveau de certains paramètres plasmatiques diffèrent chez les hommes et chez les femmes (58, 59, 60, 61). A notre connaissance, aucune étude de comparaison de la réponse à l'effort, en fonction du sexe, n'a été faite chez des sujets non entraînés. Nous n'avons pu mettre en évidence pour les paramètres chimiques, que des différences très faibles, non significatives, dans la réponse à l'effort entre hommes et femmes. Ces résultats sont discutables, si on pense à la différence des masses musculaires, en fonction du sexe et à leurs mises en jeu dans l'exercice.

1.2.2.2. Influence de l'âge

L'âge est aussi un facteur important. De nombreuses études (58, 59, 60, 61) ont montré que le niveau au repos de certains paramètres plasmatiques, chez le sujet sain, varie avec l'âge. Nous avons cherché à savoir s'il en était de même de la réponse à l'effort. Nous n'avons trouvé aucune différence significative chez les femmes. Chez les hommes, les variations de l'urée, après un effort, sont significativement ($p < 0,001$) différentes chez les sujets de 40 à 50 ans, par rapport à ceux de 20 à 30 ans ou 30 à 40 ans. Il en est de même pour les protéines, mais le degré de signification est bien inférieur ($p < 0,05$).

Pour les autres paramètres plasmatiques, aucune différence dans la réponse à l'effort ne peut être retenue, les degrés de signification étant trop faibles.

1.2.2.3. Influence de l'entraînement ou de l'activité physique

Ses effets seront étudiés plus spécialement dans les chapitres II et III.

Le conditionnement physique a des effets importants sur la perfusion des muscles squelettiques et sur le métabolisme oxydatif et il entraîne une augmentation de la VO_2 maximale dans un groupe de femmes inactives alors que dans un groupe de femmes plus actives, il ne provoque aucune variation (62).

On peut considérer que l'activité physique des sujets, dans leur profession ou leurs loisirs, représente à un degré plus ou moins élevé un entraînement. C'est pourquoi, nous avons recherché les sujets "actifs" et les sujets "non actifs" ayant une profession sédentaire. Sont considérés comme "actifs" les agriculteurs et comme "non actifs" les employés de bureau ne pratiquant régulièrement ni sport, ni jardinage. Parmi les sujets étudiés, seules 8 personnes répondaient au type "actif". Ce nombre si restreint, ne nous permet pas de tirer des conclusions statistiquement valables.



1.2.2.4. Influence du poids

Nous avons recherché l'influence du poids, sur la réponse à l'effort chez les hommes de 20 à 30 ans, classe d'âge où les sujets sont les plus nombreux. Nous avons calculé pour chacun le pourcentage d'augmentation du poids mesuré par rapport au poids idéal selon LORENTZ. Nous avons ensuite comparé les moyennes des différences avant, après effort, pour chaque paramètre, chez les sujets ayant un pourcentage d'augmentation supérieur à 15 %, inférieur à 15 % et ceux n'ayant pas de "surcharge pondérale" (compris entre - 15 % et + 15 %). Nous n'avons trouvé aucune réponse à l'effort significativement différente dans ces groupes de population.

En conclusion, nous pouvons dire que même un effort de faible intensité entraîne des variations des paramètres plasmatiques. En effet, le calcium total, le phosphore, les protéines totales, l'albumine sont significativement augmentés dans tous les groupes alors que l'urée, et le glucose sont toujours abaissés. Les variations des autres paramètres (sodium, potassium, cholestérol total, créatinine, acide urique et bilirubine totale) sont moins régulières.

Ces réponses à l'effort modéré ne semblent pas soumises à l'influence du sexe, de l'âge et du poids, ce qui n'avait jamais été précisé jusqu'à présent.

Ces résultats seront comparés à ceux obtenus chez des sportifs entraînés dans le chapitre II.



VARIATIONS DES PARAMETRES PLASMATIQUES ET SANGUINS APRES UN EFFORT STANDARDISE CHEZ LE SPORTIF COMPARAISON A UNE POPULATION NON ENTRAINEE

L'entraînement produit dans l'organisme un certain nombre de modifications qui permettent au sujet entraîné d'accroître son endurance, d'améliorer ses performances... Dès 1933, STEINHAUS (63) a montré que le conditionnement physique modifie le système musculaire (augmentation de la taille, du contenu en glycogène du muscle...), le système circulatoire (développement de la taille du cœur, ralentissement du rythme cardiaque, augmentation du débit cardiaque...), la composition sanguine...

Tous ces faits ont été confirmés depuis cette époque.

L'entraînement augmente la perfusion des muscles et le nombre de mitochondries (65, 68) sans accroissement du nombre des cellules (32). Cependant, la préparation physique doit être intensive pour conduire à de tels résultats. De même du point de vue biochimique, on a pu mettre en évidence que le niveau des enzymes tissulaires est, en général, supérieur chez les individus ou les animaux entraînés (32, 64, 66, 67, 69).

Nous avons voulu connaître l'influence de l'entraînement sur la réponse à l'exercice. C'est pourquoi, nous avons mesuré 16 paramètres plasmatiques ou sanguins, avant et après un effort standardisé, effectué par des sportifs bien entraînés. Les résultats obtenus sont discutés en fonction de ceux de la littérature et sont comparés à ceux des sujets non entraînés.

2.1. MATERIEL ET METHODES

2.1.1. DEFINITION DE LA POPULATION

20 membres professionnels ou juniors de l'équipe de football de l'Association Sportive de Nancy-Lorraine ont été soumis à un effort standardisé plus intense que celui imposé aux sujets non entraînés.

Nous avons réuni dans le tableau VI certaines caractéristiques comme le poids et la taille qui permettent une définition plus exacte de la population. Nous avons aussi calculé le poids idéal selon LORENTZ et le pourcentage de surcharge pondérale.

TABEAU VI : DESCRIPTION DE LA POPULATION ENTRAINÉE (AGE, TAILLE, POIDS, POIDS IDEAL ET "SURCHARGE PONDERALE")

SUJETS	AGE (années)	TAILLE (cm)	POIDS (kg)	POIDS IDEAL (kg)	SURCHARGE (%)
1	19	180,0	83,7	72,5	+ 15,4
2	24	167,8	65,5	63,3	+ 3,5
3	21	166,4	71,8	62,3	+ 15,2
4	22	179,0	78,5	71,8	+ 9,3
5	25	181,9	82,2	73,9	+ 11,2
6	18	181,7	81,8	73,8	+ 10,8
7	31	164,0	65,5	60,5	+ 8,3
8	22	177,6	67,9	70,7	- 4,0
9	28	175,5	76,9	69,1	+ 11,3
10	24	173,4	76,6	67,6	+ 13,3
11	28	179,0	72,2	71,8	+ 0,6
12	34	173,2	70,0	67,4	+ 3,9
13	27	168,0	66,7	53,3	+ 25,1
14	25	179,0	78,8	71,8	+ 9,7
15	28	182,0	73,4	74,0	- 0,8
16	21	176,5	63,9	69,9	- 8,6
17	27	172,2	66,2	66,7	- 0,8
18	22	173,5	69,5	67,6	+ 2,8
19	27	182,1	82,0	74,1	+ 10,7
20	27	174,3	73,2	68,2	+ 7,3

2.1.2. DEFINITION DE L'EPREUVE D'EFFORT

Ces sujets étant bien entraînés, il leur a été demandé un effort un peu plus violent que celui qui est imposé à la population passant un bilan de santé au Centre de Médecine Préventive.

Ils ont été soumis à une épreuve de 15 minutes, en 3 paliers de 5 minutes à 50 - 100 et 150 W.

Comme dans l'étude précédente, la fréquence cardiaque est surveillée pendant l'exercice. Dès la fin du travail, un électrocardiogramme est enregistré et le second prélèvement est effectué.

2.1.3. PRELEVEMENTS

Ils sont effectués dans les conditions décrites précédemment.

2.1.4. METHODES ANALYTIQUES

Les paramètres chimiques sont dosés comme précédemment à l'aide d'un autoanalyseur séquentiel SMA 12/60 Technicon.

Le taux de glucose plasmatique est mesuré grâce au même appareil, à l'aide d'une méthode à la glucose-oxydase.

Les dosages du lactate et du pyruvate sanguins sont effectués par méthodes enzymatiques °.

Les paramètres sanguins (numération des leucocytes, des érythrocytes, hématocrite et hémoglobine) sont mesurés à l'aide d'un appareil Coulter S.

2.2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus pour les 20 sujets sont regroupés dans le tableau suivant. Ici encore les résultats sont exprimés en unités classiques et en nouvelles unités (5).

Seules sont significatives, les variations du phosphore, de l'albumine, de l'urée, de la bilirubine, du pyruvate, du lactate, des érythrocytes, des leucocytes et de l'hématocrite.

° Biochemica Test Combination BOEHRINGER : lactate 15972 TLAA
pyruvate 15973 TPAA

TABLEAU VII : VARIATIONS DUES A L'EFFORT DES PARAMETRES PLASMATIQUES
ET SANGUINS CHEZ 19 ATHLETES (moyennes et coefficients
de variation)
(Degrés de signification : *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$)

Paramètres mesurés	Anciennes unités			Nouvelles unités			% de variations
		Avant effort	Après effort		Avant effort	Après effort	
Calcium total	mg/l	100,4	100,3	mmol/l	2,50	2,49	- 0,10
Phosphore	mg/l	34,6	37,0	mmol/l	1,12	1,19	***+ 6,94
Protéines totales	g/l	79,5	81,0				+ 1,89
Albumine	g/l	45,2	46,1	μmol/l	65,51	66,81	+ 1,99
Glucose	g/l	0,82	0,85	mmol/l	4,55	4,72	+ 3,66
Cholestérol total	g/l	2,16	2,19	mmol/l	5,58	5,68	+ 1,39
Urée	g/l	0,41	0,40	mmol/l	6,77	6,60	***- 2,44
Acide urique	mg/l	55,3	55,1	μmol/l	329,2	328,0	- 1,37
Créatinine	mg/l	10,8	10,8	μmol/l	9,56	9,56	0
Bilirubine totale	mg/l	5,5	6,1	μmol/l	9,40	10,43	**+ 10,91
Pyruvate	mg/l	7,4	11,3	μmol/l	84,00	128,26	+ 52,70
Lactate	mg/l	98,4	201,6	mmol/l	1,09	2,24	***+ 104,88
Leucocytes	$\times 10^2/\text{mm}^3$	62,4	70,2	G/l	6,24	7,02	**+ 12,50
Erythrocytes	$\times 10^4/\text{mm}^3$	466,3	472,7	T/l	4,663	4,727	+ 1,37
Hématocrite	%	43,8	44,8	l/l	0,438	0,448	**+ 2,28
Hémoglobine	g/l	149,7	153,2	mmol/l	9,29	9,51	+ 2,34

G/l = giga/litre = 10^9 /litre

T/l = téra/litre = 10^{12} /litre

2.2.1. COMPARAISON DES VALEURS OBTENUES CHEZ LES SPORTIFS ET LES SUJETS NON ENTRAÎNÉS

Pour certains paramètres (calcium, phosphore, protéines, albumine, urée, acide urique, créatinine, bilirubine et cholestérol), nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus chez 20 jeunes hommes ayant à peu près les mêmes âges, poids et tailles que les sportifs entraînés et soumis à l'épreuve de travail décrite au chapitre I. Il ne peut y avoir de comparaison véritable puisque les sujets n'ont pas tous effectué le même exercice. On ne peut que déduire certaines "tendances" de ces deux groupes d'individus. Le graphique suivant montre les variations des électrolytes et des protéines.

2.2.1.1. Electrolytes et protéines (figure 2)

Calcium total

Les variations du calcium, chez les sujets entraînés ou non, présentent les mêmes caractéristiques. Il se produit parfois une augmentation, parfois une diminution. Les valeurs, au repos, sont assez dispersées.

Phosphore

Il se produit une augmentation significative après effort. Cependant, on note une diminution du phosphore après exercice chez 3 sujets non entraînés. Les variations sont de plus faible amplitude chez les sportifs.

De plus, une augmentation des valeurs, au repos, s'observe chez les sujets entraînés, par rapport aux sujets non entraînés. Cette différence est significative. Le phosphore pourrait donc être un indice d'entraînement.

Protéines totales et albumine

Les protéines totales et l'albumine plasmatique sont augmentées ou parfois faiblement diminuées après l'épreuve. Parmi les sportifs, un sujet cependant montre une très grande diminution des protéines et de l'albumine. De son propre aveu, cet athlète s'est trouvé très fatigué à la fin de l'exercice.

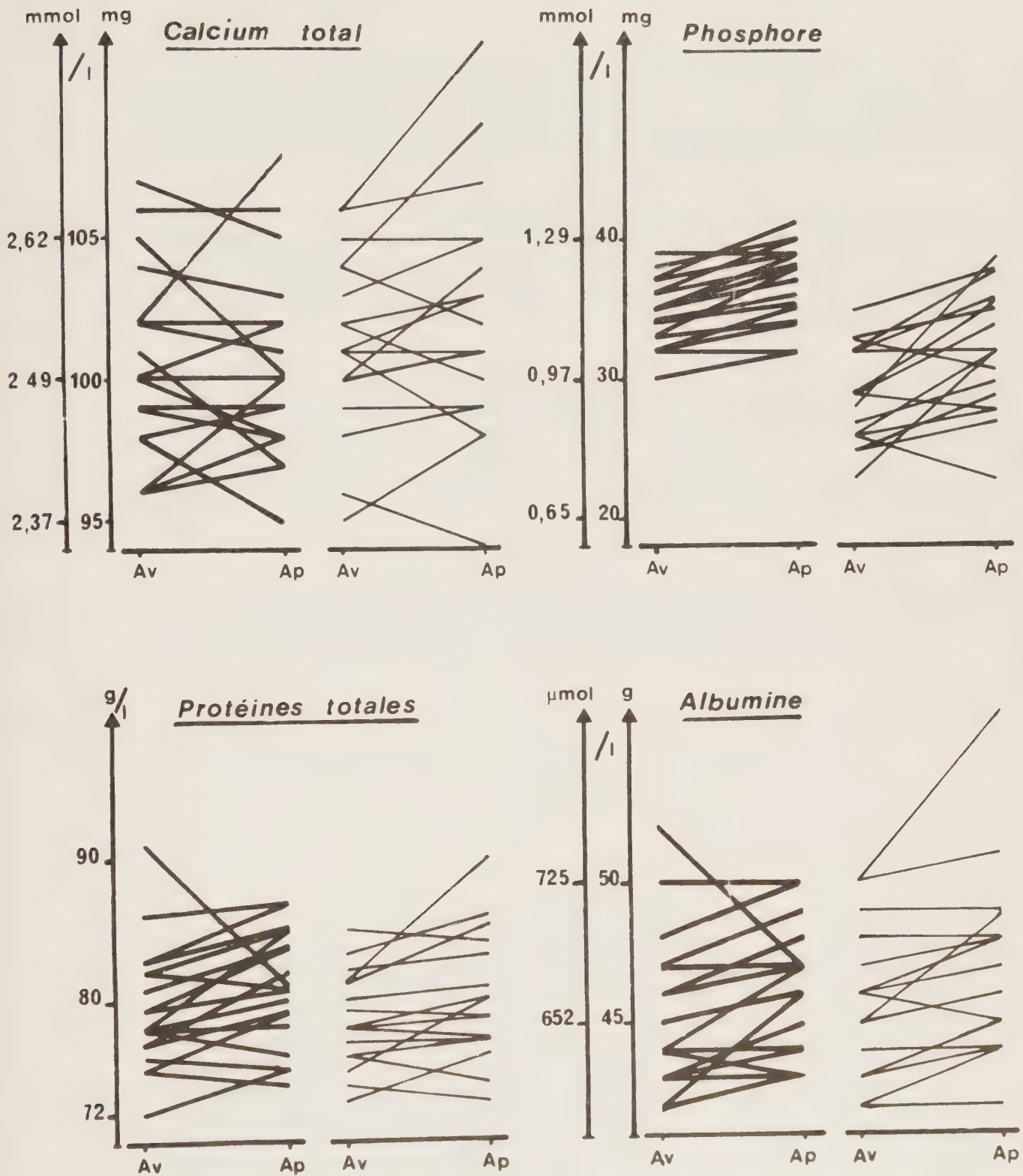


Figure 2 : Modifications dues à l'effort des niveaux plasmatiques du calcium du phosphore, des protéines et de l'albumine chez des sportifs entraînés (—) et chez des sujets non entraînés (—).

Dans l'ensemble, ces résultats sont en accord avec ceux de POORTMANS (28) qui trouve une augmentation de 9 % pour les protéines totales et de 10 % pour l'albumine après un effort exhaustif chez le sportif et de HARALAMBIE (70) qui obtient une augmentation de 6 % après 1 heure de course ou de travail sur cycloergomètre.

Il a été démontré qu'un programme d'entraînement peut produire une augmentation significative de la capacité oxydative, de l'activité enzymatique et des protéines totales de la fraction mitochondriale du muscle squelettique (32). HAMBERGER et coll. (33) ont montré que l'augmentation résultait d'une "néosynthèse" des protéines mitochondriales.

Il n'existe aucune différence importante entre les variations observées chez les sujets entraînés ou non. Cependant, CANTONE et CERRETELLI (24) ont trouvé que la valeur de repos des protéines sériques est augmentée après un programme d'entraînement et surtout que la variation due à une épreuve de travail est moins importante après une préparation physique intense. Dans notre étude, ceci n'est pas clairement mis en évidence.

En ce qui concerne les ions et les protéines totales, seules les valeurs au repos du phosphore sont très différentes chez les athlètes et les sujets non entraînés. Les variations dues à l'effort ne montrent pas de différences chez les sportifs et les sujets non entraînés.

2.2.1.2. Produits du catabolisme (figure 3)

Urée

Aussi bien chez les sportifs que chez les autres sujets, l'urée plasmatique a nettement tendance à diminuer. L'amplitude des variations est faible mais systématique. Ces résultats sont différents de ceux de HIGHMAN et coll. (71) et GARBUS et coll. (52) qui observent, chez le rat, d'une part, une augmentation de l'urée après un effort exhaustif (de 16 heures), d'autre part, une augmentation moins importante chez l'animal entraîné, par rapport à celle mesurée chez le rat non entraîné. Ces divergences peuvent être dues au fait que ces auteurs travaillent sur le rat, et que l'effort imposé est très intense et épuisant, contrairement à celui que nous faisons pratiquer à nos sujets. HARALAMBIE (86) trouve aussi une augmentation de l'urée chez l'homme après un effort exhaustif.

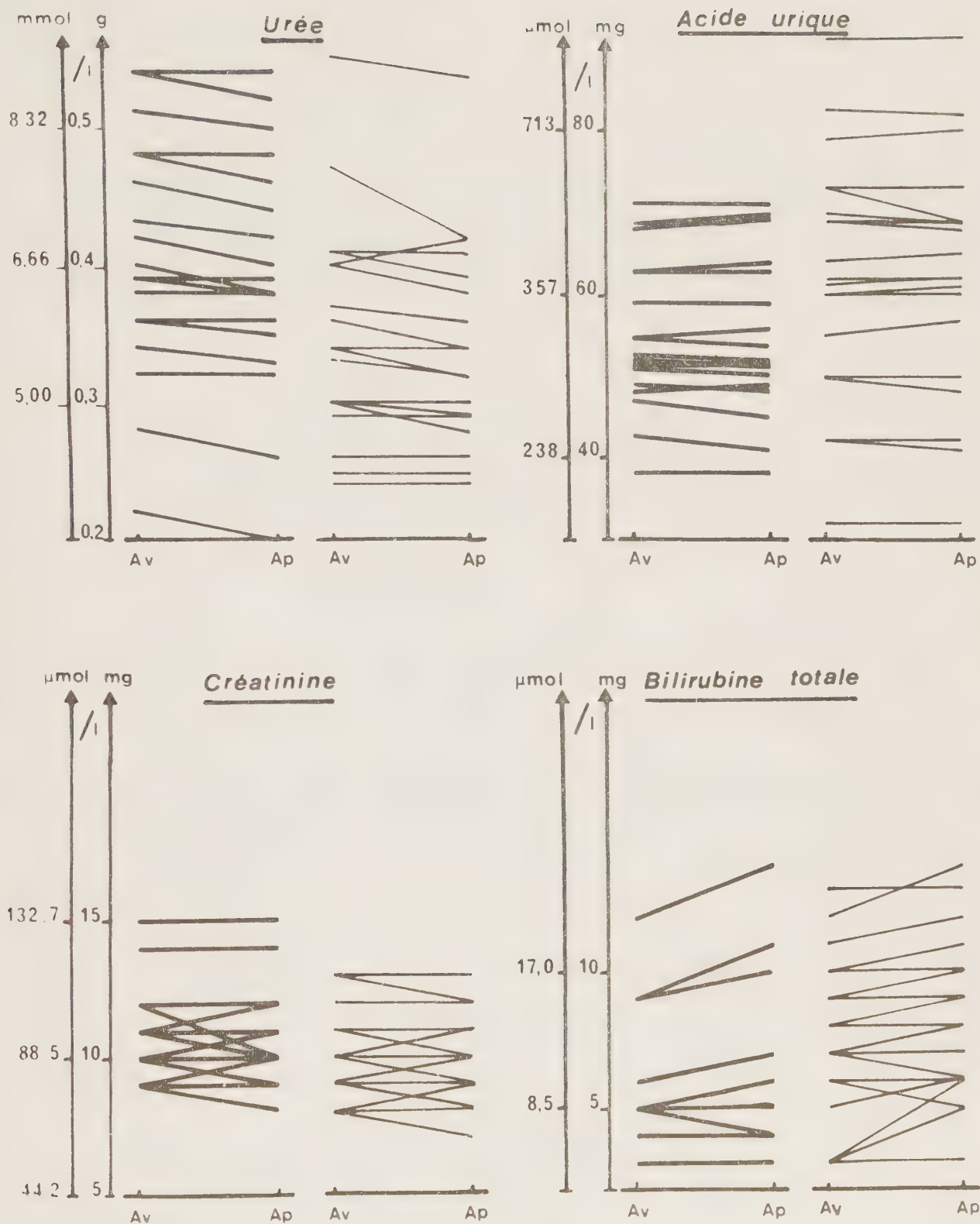


Figure 3 : Modifications dues à l'effort des niveaux plasmatiques, de l'urée, de l'acide urique, de la créatinine et de la bilirubine chez 19 sportifs (—) et chez 20 sujets non entraînés (---).

Acide urique

Un exercice se traduit, soit par une augmentation, soit par une diminution de l'acide urique plasmatique. Ces résultats sont en accord avec ceux de CALVY et coll. (72) qui n'ont trouvé aucune variation de l'acide urique sérique chez des "marines" américains soumis à un programme intense d'entraînement. De plus, les valeurs de ce paramètre sont plus dispersées chez les sujets non entraînés.

Créatinine

Le taux de la créatinine sanguine varie peu chez les sujets entraînés comme chez les individus non entraînés. Il se produit parfois une augmentation, une diminution ou aucune variation. Dans tous les cas, ces fluctuations sont très faibles et restent de l'ordre de la reproductibilité de la technique de mesure de la créatinine.

Bilirubine totale

Ici encore, les variations sont très faibles (3 mg/l au maximum). On observe plus souvent une augmentation, à l'exception de trois cas où il se produit une légère diminution. HARALAMBIE (26) a trouvé une augmentation chez environ 16 % des athlètes examinés.

Tous ces résultats sont peu probants parce que les variations sont de faible amplitude et parfois de sens contraires. Nous n'avons pas pu comparer nos résultats à ceux de la littérature, celle-ci étant très peu développée sur ce sujet. Cependant, nous avons pu les comparer à ceux obtenus avec une population témoin, non entraînée (chapitre I).

2.2.2. EXAMENS SPECIAUX EFFECTUES CHEZ LES SPORTIFS

Dans la suite de notre travail, nous avons effectué un certain nombre de mesures spéciales chez les sujets entraînés.

2.2.2.1. Substrats et métabolites (figure 4)

Glucose

La mesure du glucose sanguin est effectuée après effort, mais la méthode d'analyse ayant changé, il ne nous a pas été possible de réunir une population témoin, non entraînée.

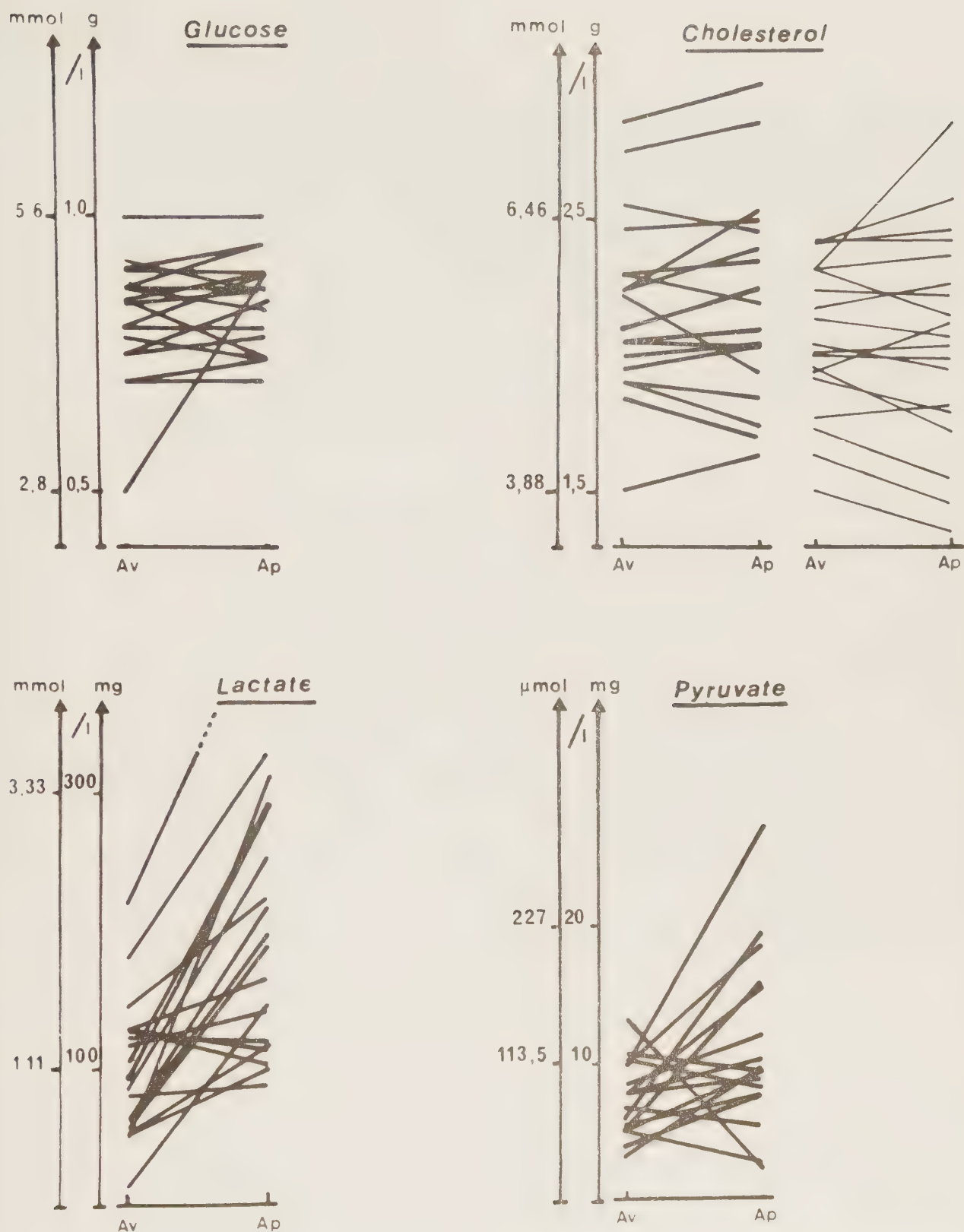


Figure 4 : Variations chez les sportifs du glucose, du cholestérol, du lactate et du pyruvate après un effort standardisé. Seuls les résultats de la cholestérolémie, chez les athlètes (—) ont pu être comparés à ceux de sujets non entraînés (—).

Dans notre étude, les variations du glucose, toujours de faible amplitude, sont désordonnées. Dans un cas, le glucose passe de 0,50 à 0,90 g/l sans explication possible. D'après ROCHE et coll. (35) il se produirait une diminution de la glycémie à l'effort aussi bien chez les sportifs que chez les sujets non entraînés. Cette décroissance ne débiterait pas avec l'exercice, mais le plus souvent 5 à 10 minutes après le début de l'épreuve de travail. Contrairement à ces résultats, SUTTON et coll. (37) ont trouvé une augmentation de la glycémie chez les sujets entraînés alors qu'elle diminue chez les sujets non entraînés. L'exercice pratiqué dans ces deux cas est un effort épuisant. Les résultats de la littérature, comme les nôtres, sont contradictoires. Il semble que les variations du glucose sanguin, après un effort chez des sportifs, soient fonction du degré d'entraînement des sujets, de la durée et de l'intensité du travail.

Cholestérol total

Ici encore, le sens des variations ne ressort pas clairement. Il est impossible de dégager une "tendance" à l'augmentation ou à la diminution. Comme nous, certains auteurs (45, 73) n'ont pas obtenu de variations significatives dues à l'entraînement, alors que d'autres (46, 74) ont mis en évidence que le cholestérol sanguin est plus faible chez des athlètes, par rapport à son niveau chez des sujets non entraînés. Ceci n'est pas vérifié dans notre étude, où la cholestérolémie moyenne au repos est très légèrement plus faible chez les sujets non entraînés. CAMPBELL (75) quant à lui, a comparé les effets de différents types d'entraînement sur le taux du cholestérol plasmatique au repos. Les cholestérolémies sont très différentes chez des sujets qui s'entraînent au golf, au tennis, à la lutte. Certains sports (cross-country) produisent à la longue une chute du cholestérol sanguin alors que d'autres (gymnastique acrobatique, golf) se traduisent par une augmentation. Enfin, DUPERRAY et PACHECO (76) ont montré que l'entraînement produit une accélération de la cholestérogénèse hépatique et une activation du catabolisme hépatique ou de l'excrétion du cholestérol. De plus, l'âge (73) et le régime alimentaire ont une grande influence sur le taux de cholestérol.

Lactate - Pyruvate

En général, l'effort entraîne une augmentation de ces deux substrats. Cette augmentation est parfois très importante. Ce phénomène est maintenant bien connu et de nombreux auteurs (77, 78, 79) ont pu l'observer aussi bien dans le sang artériel que dans le sang veineux (80) et au cours de différents types d'exercice (79). L'ampleur de ces variations est subordonnée à l'intensité de l'épreuve (81, 82) et aux conditions d'entraînement des sujets.

Dans notre étude, un cas demande une attention un peu particulière. En effet, un des sujets, sportif de 22 ans, présente après effort une grande fatigue et une diminution importante du pyruvate sanguin alors que le lactate passe de 47 à 315 mg/l après effort. Le pyruvate pourrait être l'un des facteurs limitant l'aptitude au travail (82).

Amino acides

Il est généralement admis que lorsque l'approvisionnement énergétique est suffisant, les protéines ne sont pas utilisées au cours de l'exercice. Jusqu'à ces dernières années, on n'a prêté que peu d'attention aux variations des acides aminés au cours de l'exercice. L'acide aminé total reste stable ou augmente très légèrement au cours d'un effort intense et/ou long. Plusieurs auteurs ont mesuré au cours de l'effort certains amino acides, comme l'alanine, le glutamate...

Nous avons séparé et dosé les acides aminés par la méthode de MOORE et STEIN (83) avant et après l'épreuve de travail chez 5 sujets (tableau VIII).

Parmi les 16 acides aminés ainsi mesurés, seule l'alanine présente des modifications significatives. Nous obtenons en moyenne une augmentation de 34,4 %. Ce résultat est en accord avec ceux que nous avons trouvés lors d'une étude avec POORTMANS (84) à la suite d'un effort prolongé. L'alanine pourrait être synthétisée "de novo" dans les tissus de mammifères à partir du pyruvate par transamination. FELIG et WAHREN (85) ont proposé l'existence d'un cycle glucose-alanine impliquant le muscle et le foie. L'excès de pyruvate serait transaminé en alanine libérée dans la circulation. L'alanine serait transformée par le foie en glucose.

2.2.2.2. Paramètres sanguins (figure 5)

Cette étude a porté seulement sur 11 sportifs.

Tous les paramètres ont tendance à augmenter après un effort relativement peu intense.

Le nombre des érythrocytes subit des variations très peu importantes qui sont de l'ordre de la reproductibilité de la mesure. Il semble qu'un exercice très long et très intense puisse induire une polycythémie (63). Cependant, ces observations sont anciennes et nous savons actuellement qu'un tel effort produit une hémolyse intravasculaire. Il est possible qu'un phénomène contrebalance l'autre.

Il y a tendance certaine à l'augmentation du nombre des leucocytes. Aucune explication n'a pu être fournie. ALTLAND et coll. (53) trouvent aussi une légère leucocytose chez des rats après chaque période d'effort.

En ce qui concerne l'hématocrite, il se produit une augmentation légère, mais à peu près systématique. Ces mêmes auteurs (53) ont trouvé une diminution, puis une augmentation jusqu'à retour à la valeur de départ pour l'hématocrite chez des rats soumis à un programme d'entraînement très intense. Au cours d'un exercice exhaustif de courte durée, POORTMANS (28) a pu mettre en évidence une augmentation de l'hématocrite de 6 %. La variation de l'hématocrite est fonction de la charge de travail (86). Ce résultat traduirait un phénomène d'hémoconcentration. D'après POORTMANS, un transfert de fluide est nécessaire pour le transfert des nutriments et pour équilibrer l'augmentation de la pression osmotique des muscles au travail. La différence entre concentration en protéines et hématocrite est sans doute due à l'entrée de protéines dans le torrent circulatoire.

L'hypothèse d'hémoconcentration dans un effort intense, ne semble pas pouvoir être retenue dans une épreuve du type de celle pratiquée par nos sportifs. Cependant, ceci permettrait d'expliquer facilement les augmentations des nombres des érythrocytes, des leucocytes ainsi que celle de l'hémoglobine.

TABLEAU VIII : ACIDES AMINES PLASMATIQUES CHEZ DES SPORTIFS ENTRAINES

(Moyennes exprimées en $\mu\text{mol/l}$ et pourcentages de variation)

Acides aminés	Moyennes au repos	Moyennes après effort	Pourcentages de variation
Thréonine	274,4	233,3	- 15
Sérine	337,18	369,3	+ 9,5
Acide glutamique	71,8	75,2	+ 4,7
Glycocolle	195,3	193,2	- 1
Alanine	330,2	443,8	+ 34,4
Valine	33,9	37,3	+ 10
Méthionine	29,3	28,9	- 1,4
Isoleucine	65,2	65,6	+ 0,6
Leucine	119,8	120,14	+ 0,3
Tyrosine	88,7	84,5	- 4,7
Phényl alanine	69,4	64,2	- 7,5
Ornithine	92,8	97,5	+ 5,1
Lysine	190,8	192,8	+ 1
Histidine	103,9	106,5	+ 2,5
Citrulline	25,6	28,1	+ 9,8
Cystéine	304,6	304,4	0

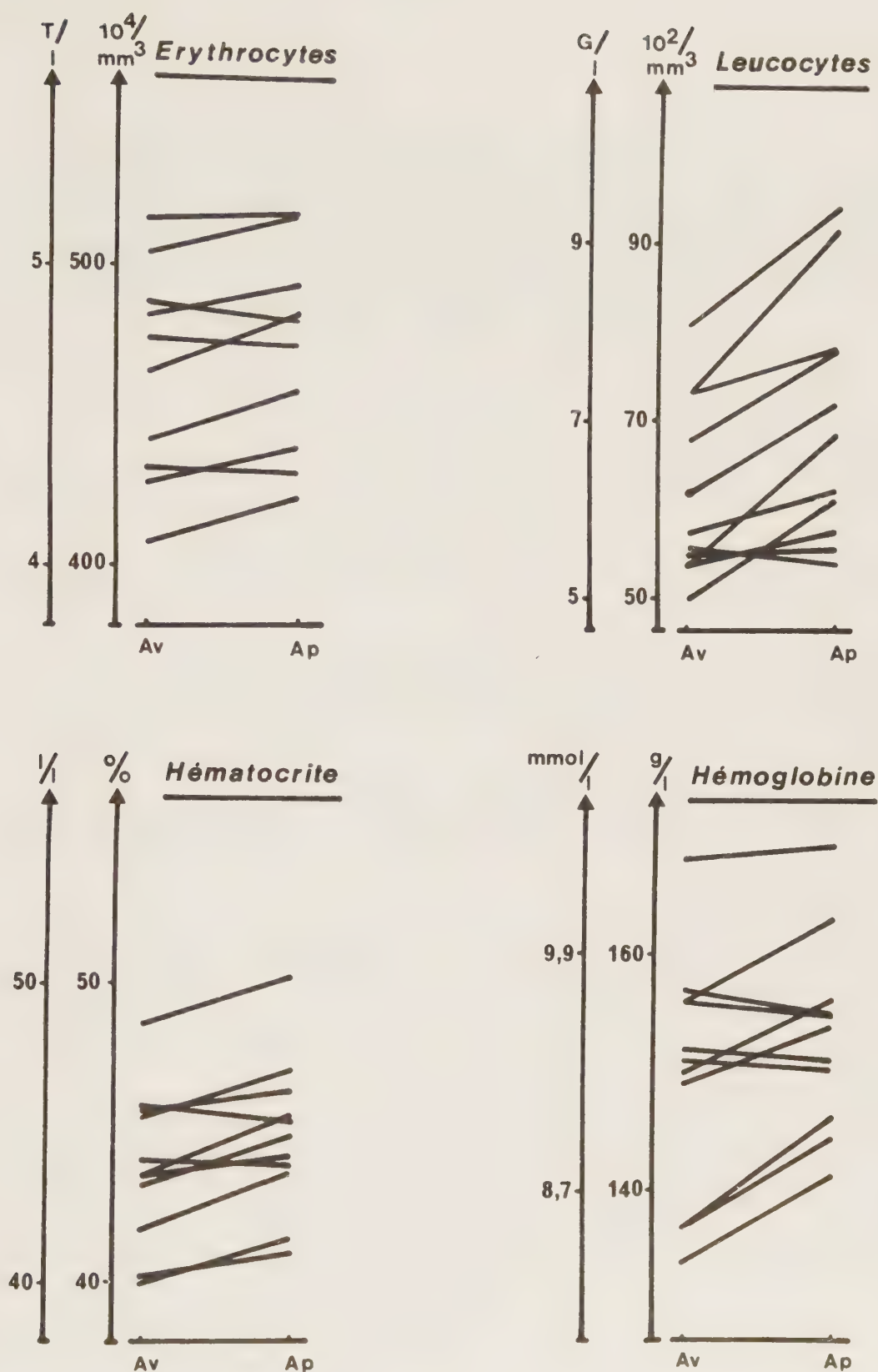


Figure 5 : Variations du nombre des érythrocytes et des leucocytes, de l'hématocrite et de l'hémoglobine chez des athlètes, à la suite d'un effort standardisé.

En conclusion, un effort même modéré provoque des modifications significatives ($p < 0,001$) du phosphore, de l'urée, du lactate et du nombre des leucocytes. D'autres paramètres sanguins montrent aussi des variations dont le degré de signification est inférieur ($p < 0,05$). Il s'agit de l'albumine, de la bilirubine, du pyruvate, du nombre des érythrocytes et de l'hématocrite. Les autres données biologiques ne varient pas. A ceci plusieurs explications possibles :

1 - La petite taille de l'échantillon ne permet pas d'"effacer" les différences individuelles.

2 - L'intensité et surtout la durée de l'effort sont insuffisantes à apporter des perturbations caractéristiques de tous les paramètres, certains étant soumis à des régulations très fines.

3 - Le degré d'entraînement d'un athlète à l'autre varie beaucoup.

Les méthodes d'analyse pourraient aussi être incriminées. Cependant, une analyse de la variance (87) a montré que la variance analytique était toujours négligeable par rapport à la variance inter-échantillon et à la variance totale et la reproductibilité des méthodes est acceptable.

L'épreuve utilisée dans notre étude, bien que de courte durée et peu intense, est capable de faire varier le lactate et le pyruvate sanguins.

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence dans la réponse à l'exercice entre sujets entraînés ou non. Cependant, le niveau au repos du phosphore est significativement plus élevé chez les sportifs et ses variations sont moins larges que celles observées chez les sujets témoins. Ce sont vraisemblablement les phosphates riches en énergie qui sont augmentées chez les athlètes (26).

Nous avons donc essentiellement étudié dans ces chapitres les variations des petites molécules. Cependant, les protéines et l'albumine mettaient déjà en évidence que le taux des macromolécules pourrait varier aussi. Mais il ne faut pas oublier la finalité et/ou le rôle de l'albumine pour le maintien de l'équilibre hydrique entre les compartiments. Par contre, les comportements des enzymes plasmatiques sont susceptibles de se différencier.

VARIATIONS DES ENZYMES PLASMATIQUES AU COURS DE L'EXERCICE

L'exercice entraîne de nombreuses modifications des enzymes tissulaires, en particulier du muscle squelettique. Ces variations seront étudiées plus en détail dans la suite de notre travail. Il est logique de penser que les changements survenant au niveau des tissus se répercutent sur les activités enzymatiques du plasma.

Nous passerons tout d'abord en revue les variations des enzymes plasmatiques, chez l'animal puis chez l'homme, à la suite d'efforts intenses et prolongés. Nous examinerons ensuite les résultats que nous avons obtenus pour certaines enzymes plasmatiques d'une population non entraînée et de sujets entraînés, après un exercice bref, peu intense, standardisé au maximum. Les facteurs pouvant intervenir sur la libération des enzymes après un effort seront analysés.

3.1. VARIATIONS DES ENZYMES PLASMATIQUES

Un grand nombre d'études sur les enzymes plasmatiques, au cours de l'effort, aussi bien chez l'animal que chez l'homme entraîné ou non, sont rapportées dans la littérature.

3.1.1. CHEZ LES ANIMAUX

Les figures 6, 7 et 8 rassemblent les variations de la GOT, la GPT, la MDH, l'ALD, la LDH et la PA chez les animaux entraînés ou non, à la suite de deux types d'effort : course ou nage. Les épreuves appliquées sont plus ou moins longues, plus ou moins difficiles. L'animal utilisé est, en général, le rat mâle albinos de souche Wistar ou Sprague Dawley, quelquefois le cobaye (88,89, 90, 91, 92) ou même la souris (93), le lapin (94) et le cheval (95).

Sur les graphiques, les résultats sont le rapport de la mesure de l'activité enzymatique après effort et de celle mesurée avant effort. Ils ont été calculés ainsi pour permettre une comparaison qui s'avérerait impossible avec les résultats bruts de chacun des auteurs. En effet, les méthodes de mesure étant différentes, les activités sont excessivement variables.

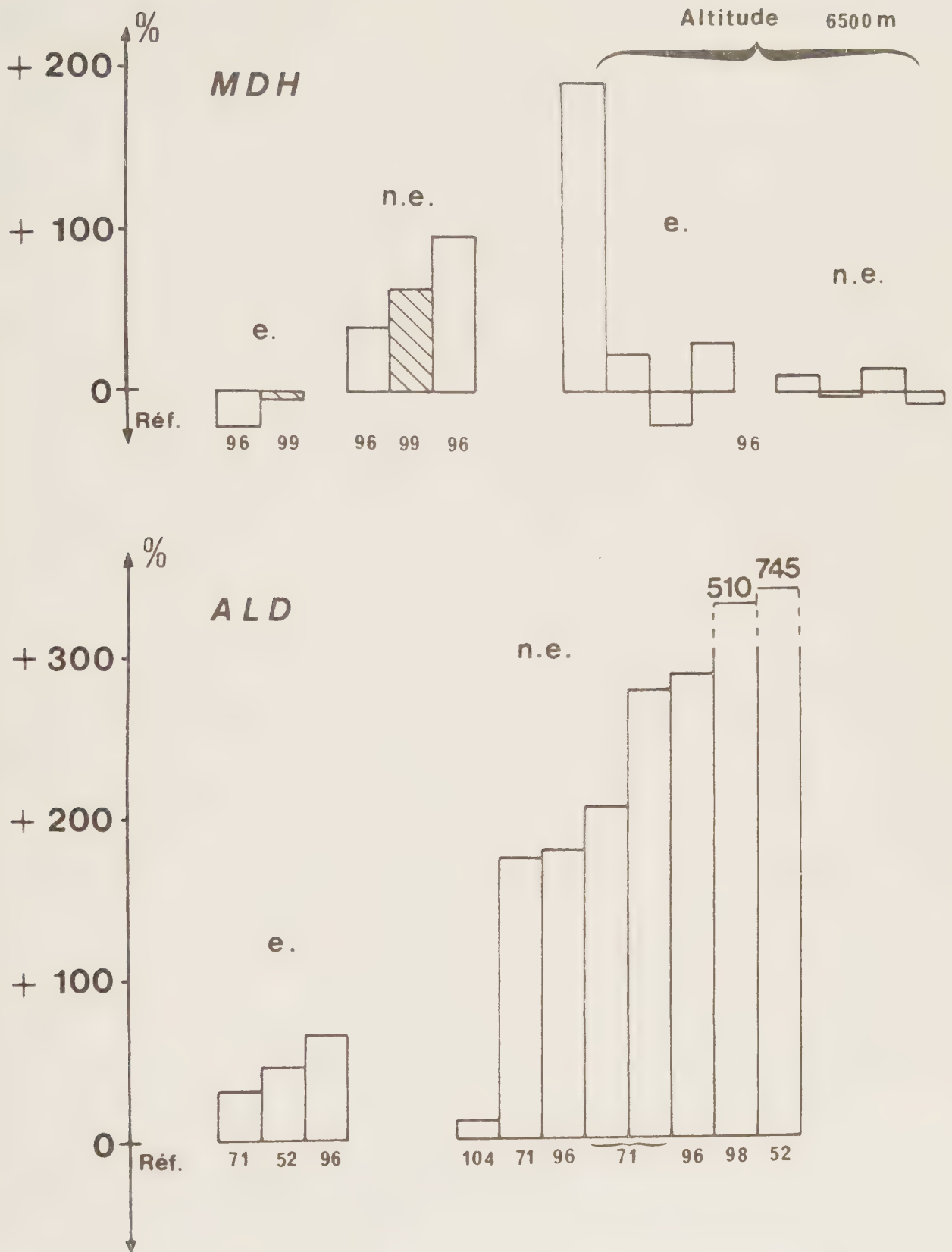


Figure 6 : Activités ALD et MDH chez les animaux entraînés (e.) ou non entraînés (n.e.) (Pourcentages de variations après effort).

Epreuves □ Course ▨ Nage

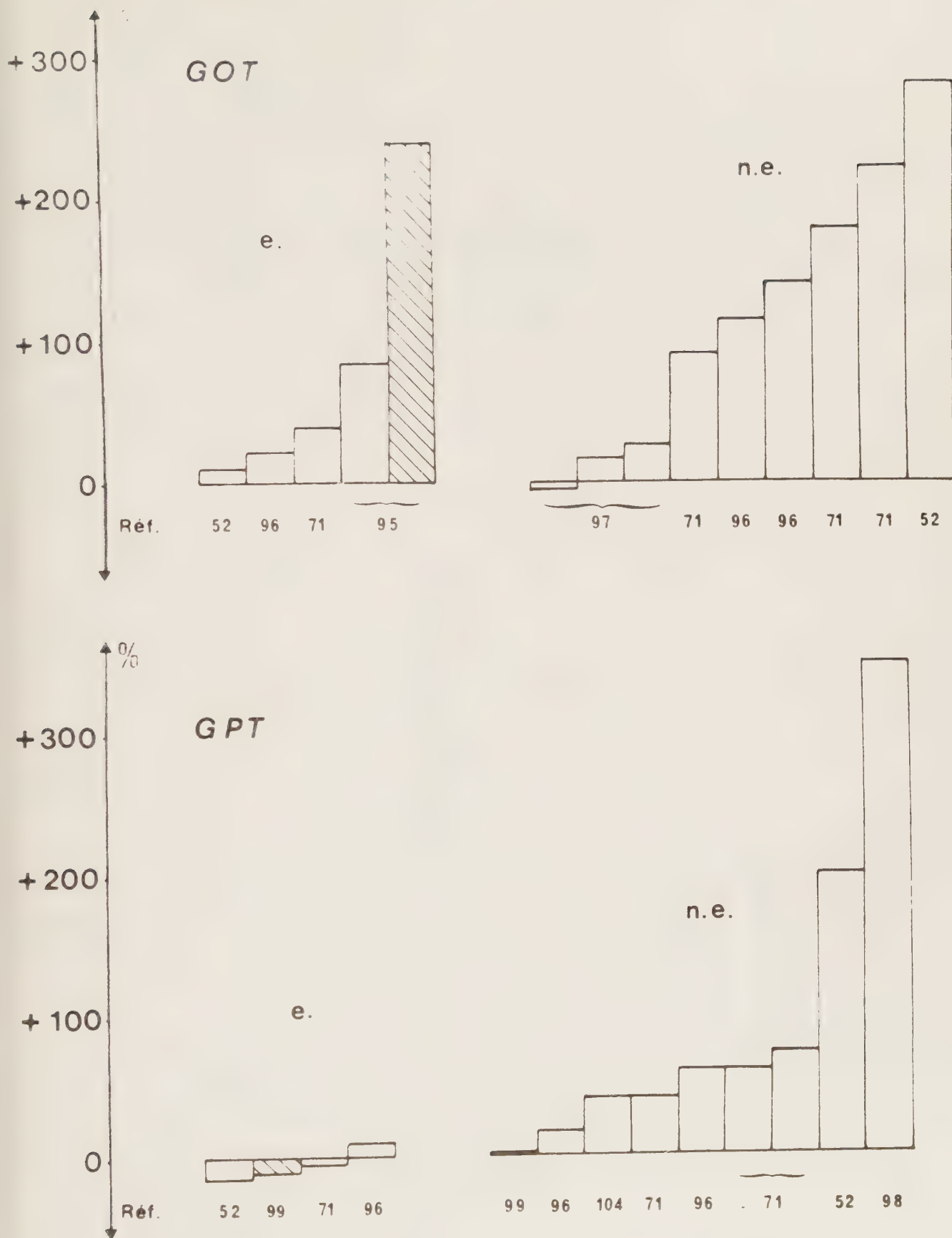


Figure 7 : Activités GOT et GPT chez les animaux entraînés (e.) ou non entraînés (n.e.) (Pourcentages de variations après effort).

Epreuves ☐ Course ☒ Nage

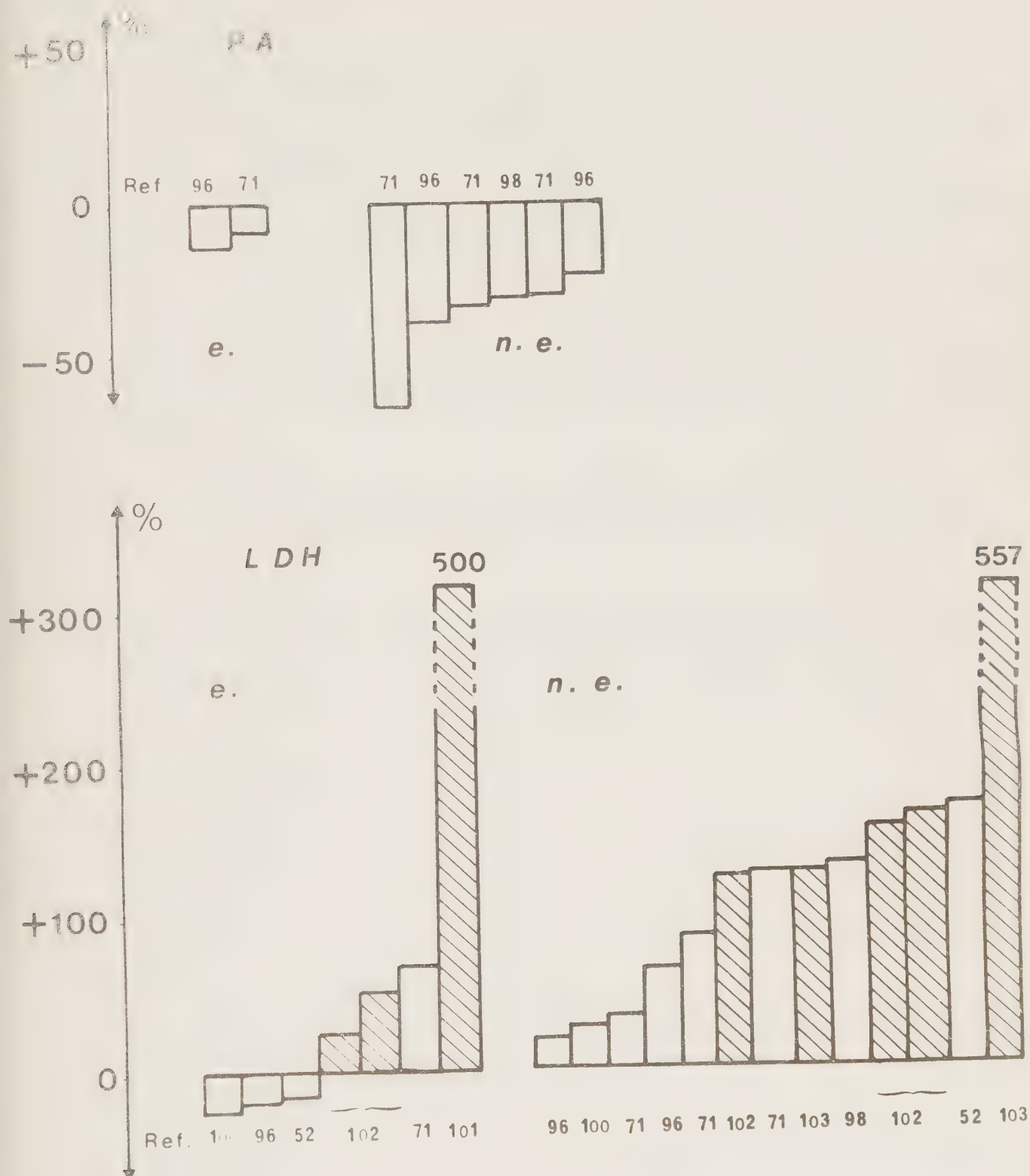


Figure 8 : Activités LDH et PA chez les animaux entraînés (e.) ou non entraînés (n.e.) (Pourcentages de variations après effort).

Epreuves □ Course ▣ Nage

Chez les animaux, nous pouvons dire d'une façon générale :

- que les résultats sont très dispersés et difficilement comparables
- que les enzymes plasmatiques ont tendance à augmenter, sauf la phosphatase alcaline qui diminue toujours après un effort
- que l'amplitude des variations est fonction de l'entraînement. En effet, chez l'animal non entraîné, l'exercice produit des fluctuations beaucoup plus importantes que chez l'animal entraîné.
- que les variations sont fonction de l'intensité de l'effort (71) et de sa durée (97).

3.1.2. CHEZ L'HOMME

Les variations observées au cours de l'effort, des activités plasmatiques de la GOT, la GPT, la LDH, l'ALD, la MDH, et la CPK sont regroupées dans le tableau IX. Aucune variation de la PA n'a pu être trouvée. Ici encore, les activités sont exprimées en pourcentages de variations.

Les enzymes sont, en général, augmentées après un effort dans le plasma ou le sérum chez l'homme. Cependant, comme dans le cas des animaux quelques discordances peuvent s'observer. Plusieurs remarques sont importantes :

- Il se produit parfois des variations considérables. La plus importante est celle de la CPK, qui, après un marathon de 53 miles, est multipliée par environ 25 (111). Cette augmentation est excessive surtout en comparaison de celles obtenues par d'autres auteurs qui trouvent des variations de l'ordre de 100 %, exception faite de BAUMANN et coll. (106) qui observent des élévations de 200 et même 500 %.

- Lorsque l'intensité de l'exercice augmente, il se produit un accroissement de l'activité enzymatique du plasma (109, 125).

- Lorsque des sujets entraînés et non entraînés pratiquent la même épreuve d'effort intensif, l'augmentation des activités enzymatiques chez les individus entraînés est moindre que celles obtenues chez les non entraînés (69, 108, 109, 110, 126).

- Le type d'effort, sa durée, son intensité interviennent dans l'amplitude des variations enzymatiques.

Les variations sont difficilement comparables. Pour une même espèce et un même effort, et en particulier chez l'homme, il faudrait pour le moins utiliser des références connues telle la masse musculaire ou des coefficients permettant de la retrouver ou de l'approcher au mieux.

Les activités d'autres enzymes ont bien sûr été mesurées (127, 128). Les résultats de la littérature sont très intéressants. Cependant, les épreuves imposées sont très intenses, souvent même épuisantes. Nous avons voulu connaître les effets d'un exercice peu intense, de courte durée, effectué d'une part par des sujets non entraînés, non triés, faisant partie de la population lorraine, et d'autre part par des footballeurs supposés bien entraînés.

TABLEAU IX : VARIATIONS DES ENZYMES PLASMATIQUES DUES A L'EFFORT CHEZ L'HOMME.
RESULTATS DE LA LITTERATURE

N°	AUTEUR	EFFORT			GOT	GPT	LDH	ALD	MDH	CPK	
		Type	Durée	Intensité							
105	AHLBORG	Ergomètre	90 mn	Max.	+ 22,7	+ 5,0	+ 13,3			+ 94,0	e.
106	BAUMANN	Travaux divers	1 jour 1/2		+ 53,6	- 7,7	+ 31,5	+ 7,9		+ 53,0	n.e.
		Boxe	30 mn		- 8,7	- 26,0	- 6,7	0		- 1,4	e.
		Course	120 mn			+ 55,0	- 9,0			+ 267,9	e.
		Ergomètre					- 20,0			- 3,8	n.e.
							- 5,0			+ 585,7	e.
							+ 17,6			+ 231,8	n.
107	BLOCK	Ergomètre	23 - 32 mn		+ 53,0	+ 20,0	+ 46,3	+ 46,3		+ 137,5	n.e.
24	CANTONE	Course	30 mn	8 km/h + 3°				+ 100,0			n.e.
108	CRITZ	Harvard step test			- 46,7						n.e.
					- 19,9						e.
109	FOWLER	Course	15 mn	15 miles/h + 3°	+ 10,0	+ 25,0	+ 1,9	+ 5,6	+ 16,0		n.e.
				+ 5°	+ 56,0	+ 75,0	+ 11,1	+ 14,0	+ 16,3		n.e.
				+ 8°	+ 52,6	+ 90,9	+ 17,5	+ 3,4	+ 57,1		n.e.
				+ 11°	+ 94,1	+ 93,3	+ 23,9	+ 22,2	+ 69,6		n.e.
				+ 11°	+ 82,3	+ 75,0	+ 7,7	+ 35,7	+ 26,7		e.
110	GARDNER	Course	15 mn	5 miles/h + 11°	+ 102,0	+ 110,0	+ 28,0	+ 46,0	+ 73,0		n.e.
					+ 60,0	+ 71,0	+ 8,0	+ 33,0	+ 26,0		e.
111	GRIFFITHS	Marathon	53 miles 25 miles	3,5 miles/h						+ 2438 + 560	
112	HALONEN	Marche	120 mn	16 km	+ 10,3		+ 56,8	+ 29,9	+ 32,6		e.
2	HUDGSON	Marche	55 - 65 mn	3 miles	+ 17,5					+ 65,0	n.e.
69	HUNTER	Ergomètre	max. max. 30 mn	max. max.	+ 100,0 + 65,0 + 55,0		+ 9,0 + 8,8			+ 36,0 + 11,0 + 18,5	n.e. e. n.e.
113	KUSTNER	Ergomètre	15 mn 3 x 15 mn en 8 h	150 W 150 W						+ 1,3 + 75,0	
114	Mac KECHNIE	Marathon	53 miles		+ 53,8	+ 42,8	+ 23,9	+ 387,0			e.
22	METIVIER	Course	30 mn	7 miles/h	+ 6,0						e.
115	OTTO	Ergomètre	25 mn	25+50+150 W	- 20,0	+ 4,0	- 3,0		+ 4,0		n.e.
116	POORTMANS	Cross-country	20 mn		+ 54,4	+ 44,6					e.
117	REMMERS	Divers	2 jours		+ 948,0						e.
118	ROSE						+ 48,0			+ 100,0	e.
119	ROSE	Course 10000 m					+ 24,1				e.
120	SCHLANG	Rame Divers			+ 77,4 + 91,8	+ 53,0 + 55,0					
121	SCHWARTZ	Ergomètre	20 mn 30 mn	600 kpm/mn 720 kpm/mn		+ 10,9 + 8,7	+ 9,6 + 14,5		+ 16,0 + 14,2	+ 13,0 + 15,0	n.e. n.e.
122	SWATMAN	Ergomètre	10 mn	2,28 cal/mn 3,48 cal/mn	- 4,8 + 0,4	- 8,1 - 7,9	+ 8,3 - 6,1	+ 6,9 - 15,4	+ 0,3 + 0,6		n.e. n.e.
23	TOPI	Ergomètre	15 - 30 mn	fonction/sujet			+ 20,0	+ 51,0	+ 12,6	+ 600,0	n.e.
124	VEJAJIVA	Rugby Rame	80 mn 80 mn							+ 79,6 + 55,7	e. e.

3.2. EXPERIMENTATION PERSONNELLE

3.2.1. MATERIEL ET METHODES

3.2.1.1. Le choix des populations, la définition des épreuves d'effort et le mode de prélèvement ont été décrits précédemment.

3.2.1.2. Méthodes analytiques utilisées

Phosphatase alcaline

Méthode de MORGENSTERN et coll. (129). Hydrolyse du p.nitro-phénylphosphate. Adaptée à l'Autoanalyseur séquentiel SMA 12/60 Technicon. Température d'incubation 37°C.

GOT

Méthode de MORGENSTERN et coll. (130). Coloration de l'oxalo-acétate par un sel de diazonium (de N.butyl-4-méthoxymétanilide). Adaptée à l'Autoanalyseur séquentiel SMA 12/60 Technicon. Température réactionnelle 45°C.

Méthode spectrophotométrique cinétique avec "réactifs optimisés" Biochemica Test Combination Boehringer Mannheim cat.référence 15922. Automate 5010 Eppendorf. Température d'incubation 37°C.

GPT - LDH - CPK

Méthodes spectrophotométriques cinétiques à l'aide de coffrets réactifs prêts à l'emploi Biochemica Test Combination Boehringer Mannheim.

GPT réactifs optimisés cat.référence 15924

LDH test U.V. cat.référence 15764

CPK "activée" cat.référence 15926

Automate 5010 Eppendorf. Température d'incubation 37°C.

MDH

Microméthode spectrophotométrique cinétique. Réactifs Biochemica Test Combination Boehringer Mannheim cat.référence 15981
Photomètre Eppendorf à défilement automatique des cuves 1100 M. Température d'incubation 37°C.

ALD

Méthode spectrophotométrique applicable aux mesures en séries moyenne ou grande.

Méthode mécanisée de BECHTLER (131).

Appareil LKB 8600. Température d'incubation 37°C.

Méthode spectrophotométrique applicable aux petites séries. La technique étant entièrement manuelle, afin de ne pas multiplier les manipulations, nous avons préparé un mélange réactionnel stable quelques heures. Le mode opératoire est le suivant :

Pour 10 dosages, préparer le mélange réactionnel suivant :

Réactif I	5,00 ml
Réactif II	0,10 ml
Réactif III	0,02 ml

Agiter

Conservation 4 à 6 heures à +4°C.

Dans un microtube, mettre :

Mélange réactionnel	0,50 ml
---------------------	---------

Laisser incuber 5 minutes à +37°C

Sérum ou plasma	0,05 ml
-----------------	---------

Agiter

Effectuer les lectures à 366 nm en microcuvettes à l'aide d'un photomètre Eppendorf à défilement automatique des cuvettes type 1100 M.

3.2.1.3. Expression des résultats

Les recommandations internationales sont trop récentes et insuffisamment élaborées pour être utilisées. Nos résultats sont donc exprimés selon les unités classiques : milliunités par millilitre de plasma (mU/ml).

3.2.1.4. Reproductibilité

Pour chacune des méthodes, nous avons effectué une reproductibilité sur un jour en mesurant l'activité de 20 à 30 échantillons d'un pool de plasmas.

° Coffrets réactif Biochemica test Combination, Boehringer Mannheim, cat.référence 15974

TABLEAU X : ENZYMES PLASMATIQUES. REPRODUCTIBILITE DES METHODES UTILISEES
(Moyennes, écarts-type et coefficients de variation).

Activité mesurée	n	$\bar{m}$ (mU/ml)	s	C.V. %	Préparation biologique
PA	30	65,4	0,54	0,8	Plasma
GOT (méth.color.)	32	33,8	1,40	4,1	Plasma
GOT (méth.spec.)	28	23,4	0,80	3,4	Plasma
ALD (méth. mécanisée)	30	4,4	0,09	2,0	Plasma
GPT	35	36,6	1,90	5,2	Plasma
LDH	30	253,0	9,02	3,6	Plasma
CPK	50	73,8	2,10	2,9	Plasma

Pour toutes les enzymes, que ce soit une méthode colorimétrique ou spectrophotométrique, le coefficient de variation ne dépasse pas 5 %, ce qui est excellent en enzymologie.

3.2.2. RESULTATS

3.2.2.1. Dans la population non entraînée

Les variations des activités de la PA, GOT et ALD sont rassemblées dans le tableau XI.

Il se produit toujours une augmentation après effort quels que soient la tranche d'âge et le sexe du groupe étudié.

Nous avons ensuite calculé les pourcentages d'augmentation et un test de STUDENT a permis de définir le degré de signification de la variation (tableau XII).

TABLEAU XI : MOYENNES OBTENUES AVANT (Av) ET APRES (Ap) EFFORT, EXPRIMEES EN mU/ml, POUR DIFFERENTES ENZYMES DANS LE PLASMA DE SUJETS NON ENTRAINES, SOUMIS A UN EFFORT STANDARDISE

Age		PA			GOT			ALD		
		n	Av	Ap	n	Av	Ap	n	Av	Ap
H O M M E S	20-30 ans	117	46,50	47,51	117	37,80	38,63	44	4,58	4,89
	30-40 ans	45	43,76	44,49	44	39,98	41,20	46	4,62	4,98
	40-50 ans	90	46,52	47,84	88	43,70	44,35	33	4,58	4,73
F E M M E S	20-30 ans	32	32,56	33,66	33	31,61	33,61	51	3,77	3,85
	30-40 ans	37	32,95	33,35	37	28,57	30,05	44	3,59	3,82
	40-50 ans	29	36,24	37,21	29	33,76	34,55	31	3,46	3,87

TABLEAU XII : VARIATIONS OBSERVEES APRES EFFORT (exprimées en pourcentages) DANS UNE POPULATION NON ENTRAINEE (*** p<0,001 ** p<0,01 * p<0,05)

Age		PA	GOT	ALD
H O M M E S	20-30 ans	+ 2,17 **	+ 2,19 ***	+ 6,67 **
	30-40 ans	+ 1,67	+ 3,07 **	+ 7,96 **
	40-50 ans	+ 2,84 ***	+ 1,48 *	+ 3,26
F E M M E S	20-30 ans	+ 3,36 ***	+ 6,33 **	+ 2,13
	30-40 ans	+ 1,23	+ 5,20 ***	+ 6,34 *
	40-50 ans	+ 2,66 ***	+ 2,35	+ 11,86 ***

Si l'augmentation est constante, elle n'est pas toujours significative. Ces résultats sont en accord avec les observations de la plupart des auteurs. Cependant, certaines discordances persistent. C'est pourquoi, nous avons entrepris l'étude de la réponse à l'exercice, en fonction de certains facteurs physiologiques, tel le sexe, l'âge, la surcharge pondérale et l'activité socioprofessionnelle des sujets.

Influence du sexe

Il faut remarquer que si les activités au repos pour chacune des trois enzymes sont significativement supérieures chez les hommes par rapport aux femmes de la même tranche d'âge ($p < 0,001$), les réponses à l'effort ne sont jamais significativement différentes dans les deux sexes quel que soit l'âge.

Influence de l'âge

Nous avons calculé les "t" pour les valeurs au repos et les variations à l'effort de la PA, la GOT, l'ALD pour les classes suivantes : 20-30 ans et 30-40 ans ; 20-30 ans et 40-50 ans ; 30-40 ans et 40-50 ans.

Ni les valeurs au repos, ni les réponses à l'effort ne varient significativement en fonction de l'âge. Ces résultats sont valables dans les deux sexes.

Influence de la "surcharge pondérale"

Cette étude n'a été effectuée que chez les hommes de 20 à 30 ans. Pour chacun des sujets, nous avons calculé comme précédemment le pourcentage de surcharge pondérale par rapport au poids idéal et nous avons trié la population en sujets "gros" (+ 15 %), sujets "normaux" (dont la surcharge est inférieure à +15 % et dont le déficit n'excède pas -15 %) et "maigres" (déficit de plus de -15 %).

La population choisie se répartit alors ainsi :

TABLEAU XIII : REPARTITION DES HOMMES DE 20 A 30 ANS EN FONCTION DU POIDS

	PA	GOT	ALD
"Gros"	16	17	11
"Normaux"	88	88	30
"Maigres"	11	11	4

Il faut remarquer que certaines classes sont très petites. Cette étude demande à être complétée sur une population plus importante de sujets présentant une surcharge ou un déficit important.

Nous avons calculé, pour chaque enzyme, et dans chaque classe, les moyennes des réponses à l'effort et nous les avons comparées entre les classes par un test de "t". Aucune variation significative de la réponse à l'effort n'a pu être mise en évidence par cette méthode.

Influence de la catégorie socioprofessionnelle

L'étude que nous avons effectuée sur la CPK (132) avait donné des résultats intéressants sur 3000 sujets. En effet, la valeur au repos de la CPK est significativement augmentée chez les hommes "actifs" par rapport aux sujets non actifs. Chez les femmes, les différences ne sont pas significatives. Nous avons voulu examiner la réponse à l'effort en fonction de ce critère d'activité. Mais la population étant trop restreinte, il a été impossible d'obtenir suffisamment de sujets "actifs" et "non actifs" et d'effectuer une étude statistiquement valable.

3.2.2.2. Population entraînée

Elle a été étudiée sur la même population que celle choisie au chapitre II. Le nombre de sujets étant assez restreint (dix neuf) nous avons pu mesurer les activités plasmatiques de la PA, la GOT, la GPT, la LDH la MDH, l'ALD et la CPK avant et après l'épreuve standardisée.

TABLEAU XIV : MOYENNES AVANT (Av.), APRES EFFORT (Ap.) ET POURCENTAGES DE VARIATIONS DES ENZYMES DANS LE PLASMA DE SUJETS ENTRAINES
(***p < 0,001 ; ** p < 0,01 ; * p < 0,05)

	Av (mU/ml)	Ap (mU/ml)	Variation (%)
PA	45,5	47,7	+ 4,8 **
GOT	29,5	30,9	+ 4,7 *
GPT	24,6	26,1	+ 6,1 **
LDH	255,5	270,7	+ 5,9 *
MDH	79,6	92,9	+ 16,7 *
ALD	7,0	9,11	+ 30,1 ***
CPK	279,4	303,0	+ 8,4 ***

Dans ce cas, comme chez les sujets non entraînés, il se produit une augmentation significative de toutes les enzymes plasmatiques après effort. Les enzymes les plus fortement augmentées sont celles présentes en grande quantité dans le muscle (ALD, CPK, MDH). Aucune étude en comparaison à des sujets témoins n'a pu être effectuée, l'activité de ces enzymes n'ayant pas pu être mesurée dans le plasma d'individus non entraînés.

3.2.3. DISCUSSION

La discussion des résultats des variations obtenues à la suite d'un exercice est très difficile. En effet, si de nombreux auteurs ont constaté ces variations, bien peu ont cherché à les expliquer. Aucune étude, par exemple, n'a été faite pour savoir si la réponse à l'effort du point de vue biochimique variait avec les critères physiologiques. Seule l'aptitude au travail a été étudiée en fonction de l'âge (133) ou de l'activité professionnelle ou culturelle (134).

D'une façon générale, d'après nos résultats et ceux de la littérature, nous pouvons dire que les activités des enzymes plasmatiques ont tendance à augmenter après un effort. Cependant de nombreuses divergences existent. Elles peuvent être la conséquence de plusieurs facteurs :

- Problèmes techniques
- Origine tissulaire différente
- Variations inter et intraindividuelles

En premier lieu, il faut s'assurer que les variations que nous mesurons ne sont pas le fait de problèmes techniques, la mesure des activités enzymatiques restant délicate. En particulier, les activités à mesurer peuvent être très élevées et les conditions de cinétique de réaction non respectées. De même, la nature des isoenzymes peut varier et dans ce cas nous savons que les conditions optimales en substrat varient également. C'est le cas par exemple pour la MDH cytoplasmique et mitochondriale (135). Pour certains auteurs, les substrats libérés pendant l'effort pourraient inhiber les fractions rapides de la LDH (136) mais la concentration en lactate n'est jamais assez importante même après un effort violent.

Il faut être certain aussi de la qualité des prélèvements, certains anticoagulants (34, 137), des lipides (138), des médicaments (139), l'alcool, etc... pouvant interférer du point de vue analytique.

D'autre part, la rationalisation du travail et l'organisation du laboratoire doivent également éviter toute activation ou inhibition dues à la conservation. Les travaux de SCHMIDT et coll. (140) ont montré que certaines activités enzymatiques comme la GOT augmentaient dans le sérum par conservation à 37°C et que d'autres comme la GLDH diminuaient. Deux

prélèvements avant et après effort n'ayant donc pas été conservés un temps égal avant analyse peuvent donner lieu à des interprétations erronées.

De même, l'exercice peut faire varier simultanément dans le plasma le niveau des activateurs ou des inhibiteurs habituels (140). C'est le cas par exemple pour la CPK qui peut être activée par les composés à groupement thiol, dont le taux peut varier également au cours de l'effort (glutathion par exemple).

La mesure des activités enzymatiques devrait donc être complétée par une mesure du taux des protéines enzymatiques présentes. De plus, les prélèvements après effort étant effectués parfois plusieurs heures après la première prise de sang, il faut s'assurer que le constituant dont on recherche les variations à l'effort, n'est pas soumis à un rythme circadien. En effet, les variations dues simplement à ces rythmes biologiques ne sont pas négligeables et peuvent perturber les variations après effort. Ainsi les protéines totales sont soumises à une variation de 17 % dans le plasma, au cours d'une période de 24 heures (141) chez le rat.

Il faut aussi vérifier :

- le niveau de l'hémoconcentration, phénomène bien connu, par la mesure des protéines, de l'hématocrite et par la mesure du taux éventuel de l'hémolyse. Plusieurs enzymes musculaires ou certaines de leurs formes moléculaires sont présentes dans les érythrocytes (142). Or l'effort, l'exercice peut provoquer une hémolyse. Hélas certains auteurs ne semblent pas en tenir compte (143). Pourtant, le comportement du globule rouge peut même servir de modèle pour étudier la sortie des enzymes (144) dans des conditions expérimentales particulières in vitro. Les travaux de ENGLHARDT (144) ont montré que la "sortie" de la LDH des érythrocytes n'est pas parallèle à celles de l'hémoglobine ou du potassium.

- de même les leucocytes peuvent libérer des enzymes en réponse à des stimuli (145, 146) et in vitro (144). D'ailleurs, les enzymes urinaires sont souvent des enzymes provenant des leucocytes (147).

- enfin, les thrombocytes ont un comportement similaire (137, 148, 149). Le vieillissement de ces éléments figurés ou leur perturbation à la coagulation modifie la résistance de leur membrane accélérant les processus de "libération" des enzymes.

Ces trois groupes d'éléments figurés présents dans tout prélèvement sanguin permettent de comprendre les risques d'erreur qu'ils peuvent apporter :

- pendant l'effort :

- . le globule rouge par hémolyse
- . le leucocyte à cause des problèmes d'agression
- . les plaquettes par libération de catécholamines

- au cours du prélèvement par hémolyse accidentelle

- après le prélèvement si les éléments ne sont pas séparés rapidement.

De même le type de prélèvement, sérum ou plasma et dans ce dernier cas le choix de l'anticoagulant ont aussi leur importance. KLUGE et HAUG (137) ont trouvé pour la LDH des résultats sensiblement identiques sur sérum et sur plasma. En revanche, l'activité du plasma augmente si on fait croître la quantité de thrombocytes qu'il contient.

Enfin, en provoquant la coagulation et en séparant immédiatement le sérum, l'activité enzymatique augmente par simple contact des éléments figurés avec le plasma. De même lors de la rétraction du caillot, on observe une sortie plus importante d'enzymes. FRIEDEL et MATTENHEIMER (150) ont même avancé l'hypothèse que la majorité des enzymes plasmatiques viennent des éléments figurés.

Tous ces exemples sont destinés à mettre en évidence encore une fois la nécessité de précautions particulières pour pouvoir analyser des variations fines de l'activité enzymatique au cours de l'effort.

C'est pourquoi nous avons choisi de travailler sur plasma après nous être assurés que l'héparinate de lithium ne perturbe pas nos mesures d'activité enzymatique.

Ayant standardisé au maximum toutes les étapes analytiques, nous pouvons attribuer les variations enzymatiques observées à l'exercice.

L'effort entraîne des perturbations des muscles mais il faut être sûr que les enzymes qui se trouvent augmentées dans le plasma après une épreuve sont bien d'origine musculaire.

Les enzymes habituellement présentes dans le plasma proviennent déjà en majorité du tissu musculaire, du foie et de l'intestin.

En effet, la masse de ces organes en pourcentage du poids et de la teneur en protéines, divisée par la demi-vie, montre nettement que le foie, l'intestin et le muscle sont les organes prédominants (151). Mais les muscles contiennent des enzymes à demi-vie longue et, s'ils ne peuvent contribuer qu'en partie aux enzymes habituelles du plasma, leur masse (35 %), leur teneur en protéines (19 %) en font en réalité le réservoir le plus important, réservoir mis en mouvement par l'exercice et les contractions supplémentaires.

Il est donc logique de poser comme hypothèse que les enzymes augmentées dans l'effort proviennent du muscle. CERRETELLI et coll. (152) ont d'ailleurs démontré que l'ALD sortait plus rapidement et en plus grande quantité d'un muscle ayant travaillé que d'un muscle au repos.

La nature des enzymes et isoenzymes retrouvées plaide d'ailleurs en faveur de l'origine musculaire (64).

Cependant d'autres organes peuvent contribuer aussi à l'augmentation des activités enzymatiques plasmatiques : le foie (64, 153, 154) en particulier où l'OCT a été trouvée augmentée.

De plus, le flux sanguin hépatique varie inversement à la sévérité de l'exercice (155, 156) ce qui n'empêche pas la libération d'une quantité considérable de substrats dans le sang veineux (157).

Le rein (113, 158) : Un travail récent (159) a mis par exemple en évidence une augmentation de la tréhalase plasmatique et urinaire au cours de l'exercice modéré ou intense. Cette enzyme est plus particulièrement localisée dans le rein.

Pour en revenir à la relation enzymes plasmatiques augmentées dans l'exercice et enzymes du muscle, les difficultés d'interprétation proviennent du fait que

- la composition enzymatique de chaque type de muscle varie. Il y a en particulier des différences importantes entre le muscle rouge et le muscle blanc (64, 88, 154, 160). Il y a également des différences de concentrations en substrats, en particulier en créatine phosphate (161).

- pour un même muscle, il y a une certaine hétérogénéité due à la présence de cellules différentes en particulier de macrophages (162).

- la teneur en enzymes varie aussi avec l'entraînement (163, 164, 165). Cette différence peut avoir pour origine une modification de la densité des tissus qui est augmentée par entraînement (166).

- enfin, les résultats de sortie des enzymes doivent également être interprétés en fonction de la localisation intracellulaire des enzymes (151, 167). Si la majorité des enzymes musculaires habituellement mesurées est en effet localisée dans le cytoplasme, certaines formes moléculaires de GOT et MDH par exemple, sont intramitochondriales.

D'autres enfin (phosphatase acide, Dnase) se trouvent dans les lysosomes (162) et jouent un rôle peut-être important dans ces phénomènes de sortie.

L'interprétation des variations enzymatiques dans le plasma au cours de l'effort doit donc tenir compte de ces différences cellulaires ou tissulaires qui pourraient introduire des erreurs ou masquer certains résultats.

Enfin, les différences observables peuvent être dues aux variations inter et intraindividuelles, variations physiologiques ou dues à l'environnement.

Sexe

Le niveau des enzymes plasmatiques est bien entendu différent suivant le sexe. De plus, l'adaptation à l'effort est différente par exemple chez des rats mâles ou femelles (64).

Age

L'adaptation à l'effort varie avec l'âge et semble supérieure chez le jeune (153). Les mécanismes de libération sont aussi influencés par ce facteur (168), les enzymes sortant plus rapidement chez le rat âgé.

Nutrition

a) le jeûne modifie le niveau des enzymes plasmatiques (169). L'état de jeûne modifie également la vitesse de sortie des enzymes au cours des expérimentations animales (170).

b) l'alimentation

Chez les malnutris, le taux plasmatique de CPK est abaissé (171). Il augmente avec la réalimentation et l'augmentation de la masse musculaire. L'exercice entraîne une diminution de prise de nourriture (64, 172) du moins chez les mâles, ce qui se traduit par une diminution du poids de graisse de l'organisme et donc une augmentation de la capacité d'effort.

L'alimentation intervient donc (25) et doit être bien définie avant de pratiquer toute épreuve d'effort.

Vitamines

Parmi les facteurs nutritionnels, les vitamines occupent une place prépondérante non seulement parce qu'en général ce sont des coenzymes mais aussi d'une part parce que les vitamines A, E et C interviennent dans les phénomènes de sortie des enzymes (173), d'autre part parce que certains sportifs ingèrent des complexes vitaminiques, en particulier de la vitamine C. DIETER (64) a mis en évidence chez le cobaye le rôle de cette vitamine sur le niveau des enzymes plasmatiques après effort. Avant exercice, les cobayes non entraînés nourris avec des aliments contenant un taux faible en vitamine C ont une activité plasmatique de la CPK supérieure de 62 %. Après exercice, le taux de CPK plasmatique augmente chez les cobayes non entraînés sans que l'on note une différence attribuable à la vitamine C. Par contre, pour l'ALD, chez les animaux entraînés ou non, un régime carencé en vitamine C provoque une augmentation importante de l'ALD plasmatique après effort.

La vitamine C semble donc nécessaire à la stabilité des membranes, sa diminution augmente la perméabilité et diminue la résistance à l'effort.

Cependant, le cobaye a un métabolisme particulier des glucuronides.

La vitamine C n'influence pas la prise d'oxygène chez l'homme entraîné ou non (174) mais permet de régénérer le NADPH indispensable à la production d'énergie et au retard d'apparition de la fatigue (175) tandis que la vitamine E n'augmente pas les performances (176). La vitamine B₁ administrée aussi après l'effort permet la récupération rapide par action au niveau de la décarboxylation de l'acide pyruvique en excès (175).

Froid - Température extérieure

Un abaissement de la température extérieure provoque sur les organismes des modifications qu'il faut connaître.

L'adaptation au froid diminue la masse musculaire (177) et la résistance à l'effort (178) augmente la vascularisation.

Après exercice, l'augmentation des enzymes plasmatiques est moindre pour les animaux acclimatés au froid (179). De même, la congélation dans l'azote liquide d'une patte d'animal adapté 40 jours au froid, ne provoque

qu'une augmentation de 100 % des enzymes plasmatiques alors que chez des animaux élevés à température ordinaire, la CPK augmente 3000 fois (180). Les membranes semblent donc sensibles au froid (145) particulièrement les lysosomes (181).

Pour les épreuves d'effort, la température est donc un facteur important. CUTINELLI et coll. (182) viennent d'ailleurs de montrer que 10 min de nage à 20°C sont équivalentes à 60 min de nage à 28°C pour le rat, vu sous l'angle de l'augmentation de la GOT plasmatique.

Il y a enfin des différences dans la sortie de la CPK musculaire en fonction de la température (183).

L'augmentation de la température extérieure provoque aussi des perturbations (104). Certaines enzymes (LDH) sont augmentées, d'autres (phosphatases acide et alcaline, phosphohexose isomérase) sont diminuées dans le plasma d'animaux adaptés à un environnement de 37°C-42°C. L'acclimatation à la chaleur produit un changement de la perméabilité des capillaires cutanés aux macromolécules (184). Chez l'homme, il est donc nécessaire de standardiser la température extérieure lors d'une épreuve d'effort.

Entraînement - activité physique

Ce facteur, nous l'avons déjà vu, est prépondérant pour modifier la sortie des enzymes cellulaires vers le plasma au cours de l'effort. Chez les individus entraînés, les variations des enzymes plasmatiques après effort sont nettement plus faibles que chez les non-entraînés (69, 109, 110).

En dehors de l'entraînement, il faut également connaître le niveau de l'activité physique habituelle des sujets (travail, loisirs...)(185).

Anoxie - Hypoxie - Altitude

Les enzymes plasmatiques (143) sont augmentées par séjours prolongés en altitude, en hypoxie. L'effort créant une situation identique, il était logique d'attribuer l'augmentation des enzymes plasmatiques à l'hypoxie.

Il est de fait que l'hypoxie et l'anoxie ont été très souvent utilisées pour expliquer la sortie des enzymes tissulaires in vivo ou in vitro (135, 143, 154, 158, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192) dans des conditions physiologiques ou même pathologiques.

Hormones

Les hormones peuvent jouer également un rôle important dans l'effort. Certaines peuvent aussi être impliquées dans les phénomènes d'augmentation ou de sortie des enzymes. Ainsi le cortisol facilite la libération des enzymes protéolytiques extralysosomales. Il est toxique pour les lymphocytes mais il les protège contre les effets de la vitamine A (193) et des immun-sérums.

La prednisolone prévient l'augmentation de la CPK après effort. Elle permet de réduire l'augmentation due à l'effort de la CPK sérique de près de 50 % chez le chien (187).

Certains agents bloquants de l'adrénaline inhibent la sortie des enzymes mais seulement dans les cas où il y a hypoxie (194). Ils n'ont pas d'effet dans l'exercice.

Toxiques - Médicaments - Dopants

Un certain nombre de molécules médicamenteuses sont connues pour provoquer la sortie des enzymes. Nous les examinerons dans la suite de notre travail.

En conclusion, nous avons donc obtenu des augmentations significatives de la PA, GOT et ALD dans certains groupes de population non entraînée. Un effort limité est donc capable de conduire à l'augmentation des enzymes comme des petites molécules.

Cependant nous n'avons pu mettre en évidence aucune corrélation entre la réponse à l'effort et le sexe, l'âge, la surcharge pondérale et la catégorie socioprofessionnelle de ces sujets. Cette réponse négative est néanmoins un résultat original.

Chez les sportifs, toutes les enzymes dont nous avons mesuré les activités (PA, GOT, GPT, LDH, MDH, ALD, CPK) sont augmentées après effort. Cependant les variations obtenues sont plus faibles que celles observées par différents auteurs. Mais l'effort pratiqué dans notre étude est beaucoup moins intense que ceux imposés dans la littérature. De même, il y a de nombreuses différences entre les résultats. C'est pourquoi nous avons voulu trouver une explication à l'augmentation des enzymes et aux discordances observées.

En premier, le turnover des enzymes est peu connu.

D'autre part, les mécanismes de passage des enzymes du compartiment cellulaire vers le plasma sont également inconnus.

Nous avons d'abord tenté d'approcher ces mécanismes chez l'individu dans son ensemble avant de passer, dans la deuxième partie, à un échelon expérimental moins complexe in vitro.

MESURE EN CONTINU "IN VIVO" DES VARIATIONS DE LA CPK AU COURS D'UNE EPREUVE D'EFFORT



Ayant constaté sur une mesure effectuée sur un seul prélèvement, une augmentation de l'activité enzymatique, il nous a semblé intéressant d'effectuer une étude cinétique chez l'homme de ce phénomène. La courbe théorique pouvait également permettre de calculer la demi-vie de l'enzyme.

De nombreux facteurs sont connus pour accélérer ou retarder le passage des enzymes cellulaires vers le plasma. Le début du phénomène semble donc difficile à apprécier et ne correspond sûrement pas au début de l'épreuve de travail.

De plus, les enzymes comme les autres protéines peuvent avoir des taux de disparition qui ne sont pas indépendants de la concentration. Donc les enzymes déversées dans le plasma au cours d'un exercice seront éliminées plus ou moins rapidement. Le problème de la destruction des enzymes n'a pas été résolu. Aucun organe isolé n'a encore été trouvé comme lieu de destruction des enzymes. FISCHER et TAKACS (195) viennent cependant de montrer que les coupes de poumons inactivaient 47 % de la GOT en 4 h à 37°C au lieu d'une inactivation habituelle de 22 %.

Afin d'obtenir des renseignements supplémentaires sur le turnover au cours de l'effort, deux solutions étaient possibles :

- injection d'enzyme purifiée marquée puis ensuite mesure des activités enzymatiques et dosages immunologiques en fonction du temps.
- mesure en continu in vivo.

C'est cette seconde méthode que nous avons choisie.

Elle a été utilisée pour doser divers constituants sanguins, en particulier l'histamine (196), et l'acide pyruvique (197) par méthode fluorimétrique, le cholestérol (198) et le fer (199). Elle a été aussi employée pour doser l'urée dans des cas spéciaux : mesure des compartiments liquidiens chez le rat (200), surveillance d'une épuration à l'aide d'un "rein artificiel". Les activités enzymatiques de la cholinestérase (201) et de la LDH (188, 202) ont encore été mesurées par cette technique. Des déterminations simultanées de la glycémie, la pyruvicémie et la lactacidémie ont été mises au point (203, 204).

FREUND (205) a pu suivre les variations des taux de glucose, des acides lactique et pyruvique au cours de l'exercice et DUCHENE-MARULLAZ et coll. (206, 207, 208) ont étudié les modifications de l'ammoniémie au cours de la contraction musculaire et de l'excitation des voies cardio-accélératrices.

Nous avons choisi de mesurer l'activité de la CPK par cette technique pour diverses raisons.

La CPK est une enzyme à laquelle nous nous intéressons depuis un certain temps. La méthode colorimétrique de dosage de l'activité de cette enzyme en flux continu a d'ailleurs été mise au point dans notre laboratoire (209, 210). Cette méthode nous étant familière, il était possible de l'adapter à des mesures "in vivo".

La CPK est une enzyme dont l'activité varie au cours de l'effort aussi bien chez les sujets non entraînés que chez les sportifs (tableau IX).

Nous avons observé dans des travaux précédents que nous obtenions, par notre méthode colorimétrique, une augmentation d'environ 7 % de l'activité de cette enzyme chez des sujets non entraînés (211). Nous avons montré au chapitre précédent une augmentation de l'activité de 8,4 % chez les sportifs (tableau XIV).

Tout ceci portait à croire que l'activité de la CPK augmenterait chez des sportifs soumis à un effort plus intense et plus long et que le dosage en continu in vivo permettrait d'obtenir des précisions supplémentaires.

Nous avons donc adapté la méthode colorimétrique de mesure de l'activité de la CPK en flux continu à une mesure "in vivo" sur sang total. Nous avons suivi l'évolution de cette enzyme chez des sportifs au cours d'une épreuve d'effort standardisée, puis au cours de la phase de récupération.

4.1. MATERIEL ET METHODES

4.1.1. CHOIX DES SUJETS

Cinq jeunes hommes âgés de 20 à 23 ans volontaires de l'Institut Supérieur d'Education Physique de Bruxelles ont été soumis à une épreuve standardisée d'effort.

4.1.2. EPREUVE D'EFFORT

Ces sujets, sportifs entraînés, ont effectué un travail sur cycloergomètre de 30 minutes à 150-165 W (correspondant aux deux tiers de leur VO_2 maximale). La vitesse est de 60 à 70 tours par minute. Un repos allongé est ensuite accordé pendant une période de 30 minutes.

4.1.3. PRELEVEMENT

Un catheter ° est posé dans la veine cubitale. 5 ml de sang sont prélevés puis 1 ml d'une solution stérile d'héparine (correspondant à 5000 U) est injecté afin de diminuer les risques de coagulation dans le catheter et d'obstruction. Le catheter est ensuite bouché jusqu'au moment du "branchement" à l'appareil d'analyse.

Un prélèvement de 0,05 à 0,1 ml/mm, adapté au niveau de base de chaque sujet, est alors effectué pendant 65 minutes décomposées comme suit :

5 min : mise en position sur le cycloergomètre, repos
30 min : effort
30 min : repos allongé

4.1.4. METHODES ANALYTIQUES

Lactate

Nous avons utilisé la méthode précédemment décrite (cf. chapitre III).

C P K

Nous avons fait appel à la méthode colorimétrique de ROOS et coll. (209).

Principe

In vivo, la CPK catalyse la réaction réversible d'hydrolyse du créatine phosphate en créatine



° "Intracath" Bard-Davold LTD Clacton on Sea Essex, IK

In vitro, à pH 6,8, la CPK transforme le créatine phosphate en créatine. La réaction est développée à 37°C. L'addition de chloro-4 mercuribenzoate de sodium arrête la réaction et la dialyse élimine les protéines. La créatine libérée est dosée par le dioxo 2-3 butane, l'orcinol et la glucuronolactone en milieu alcalin.

Adaptation à la mesure sur sang total

Il existait plusieurs solutions possibles.

★ Mesures effectuées sur un sang débarrassé de ses hématies dès leur entrée dans le circuit analytique.

Pour cela, nous avons essayé une technique de filtration et une méthode d'agglutination.

Filtration

Nous avons interposé sur le tube de prélèvement une chambre de filtration SWINNEX 25 ° munie d'une membrane retenant les cellules et laissant filtrer les macromolécules. Nous avons essayé des membranes à pores de 0,22, 0,45 et 8 microns de diamètre. Deux inconvénients majeurs nous ont fait abandonner cette technique :

- . le volume "mort" de la chambre de filtration provoque un mélange des échantillons
- . une hémolyse très importante se produit sous l'effet de la pression des hématies contre la membrane poreuse.

Agglutination

Cette méthode a été utilisée pour le dosage du cholestérol sanguin (198). L'agent agglutinant est une phytohémagglutinine et les agglutinats sont éliminés par un filtre continu. Ne disposant pas de ce matériel et craignant que la phytohémagglutinine ne perturbe les mesures, nous avons préféré essayer la technique suivante.

Après détermination du groupe sanguin du sujet, le sang total est mélangé à une dilution isotonique de l'antisérum correspondant. Les agglutinats formés sont éliminés à l'aide d'un "débulleur" après passage dans une longue bobine à spires horizontales facilitant la sédimentation. Ici encore deux inconvénients nous ont fait éliminer ce procédé :

- . l'élimination des agglutinats n'est jamais totale et leur apparition dans les tubes entraîne des obstructions et des perturbations du circuit.
- . le coût des antisérums ne permet pas leur utilisation en flux continu pendant un temps aussi long.

C'est pourquoi nous avons essayé des techniques sans élimination des hématies.

★ Mesure sur sang total complètement hémolysé.

Il est généralement admis que les érythrocytes humains ne présentent pas d'activité de la CPK (34, 212). Certains auteurs (213) ont décelé la présence de cette enzyme dans des hémolysats d'hématies de lapin et de rat. Afin de vérifier l'activité de la CPK dans les globules rouges humains, nous avons procédé à deux sortes d'essais :

. Mesure de l'activité de culots globulaires lavés à plusieurs reprises et hémolysés à l'eau distillée

. Mesure dans le plasma et le sang total d'un même sujet après hémolyse du sang à l'eau distillée.

Aucune activité de la CPK n'a pu être détectée dans les hémolysats globulaires, ni par la méthode colorimétrique de ROOS et coll.(209) ni par une méthode spectrophotométrique.

La comparaison des activités du plasma et du sang total, après calculs de correction de la dilution due à l'hémolyse et à l'hématocrite, est peu probante. En effet, les activités sont très peu différentes, plutôt un peu plus faibles pour le sang total.

Nous n'avons donc trouvé aucune activité de la CPK dans les érythrocytes humains. Il semblait donc possible de travailler sur sang total après hémolyse. Cette méthode séduisante par sa simplicité s'est révélée inutilisable.

a) Il faut, pour que l'hémolyse soit complète, faire suivre l'addition d'eau distillée, de cycles congélation-décongélation rapides, procédé inutilisable en continu ou ajouter des substances comme la digitonine ou la saponine qui peuvent interférer dans les mesures d'activités enzymatiques.

b) Si les érythrocytes ne montrent pas d'activité de la CPK, ils contiennent un taux élevé de dérivés guanidiques totaux, créatine en particulier (214). Il faut donc effectuer un essai à blanc pour différencier la créatine érythrocytaire de la créatine libérée par action de la CPK. Ceci est impossible, la différence entre les deux taux de créatine très faible.

c) L'analyse de la fraction plasmatique du sang total doit être suivie de corrections dues aux dilutions entraînées par l'addition de l'agent hémolysant et par l'hématocrite. Ces corrections sont plus ou moins précises. Dans notre cas, en plus de l'activité de la CPK, l'hématocrite peut lui aussi subir des modifications au cours de l'effort.

C'est pourquoi nous avons fait appel à un autre processus :

★ Mesure sur sang total non hémolysé

La réaction enzymatique est effectuée avec le sang total dilué à l'aide d'une solution isotonique puis les hématies sont éliminées par dialyse. Les réactifs sont amenés à l'isotonicité, l'absence d'hémolyse est vérifiée, un essai à blanc est effectué.

Cette méthode s'est révélée adéquate selon le mode opératoire suivant :

** Réactifs

I. Solution tampon pH = 6,8

. Imidazole (Merck)	13,6 g
. Acétate de magnésium, 4 H ₂ O (Merck).....	4,3 g
. Eau distillée	800 ml

Ajuster à pH = 6,8 avec de l'acide acétique

. Eau distillée	q.s.p. 1000 ml
-----------------------	----------------

II. Solution de créatine phosphate

. Créatine-phosphate, sel de sodium (NBC).....	0,2375 g
. Tampon (R.I.)	12,5 ml
. Eau distillée	q.s.p. 50 ml

Conservation à +4°C pendant une semaine

III. Solution d'adénosine diphosphate

. Adénosine diphosphate, sel de sodium (NBC)....	0,266 g
. Tampon (R.I.)	25 ml
. Eau distillée	q.s.p. 50 ml

Conservation à +4°C pendant une semaine

IV. Solution de mercapto-éthanol

. 2 mercapto-éthanol (Fluka).....	0,1 ml
. Tampon (R.I.).....	50 ml

Préparation extemporanée

V. Substrat

. Solution de créatine phosphate (R.II.).....	50 ml
. Solution d'adénosine diphosphate (R.III.).....	50 ml
. Solution de mercapto-éthanol (R.IV).....	50 ml
. Chlorure de sodium (Merck)	2,56 g
. Eau distillée.....	q.s.p. 150 ml

Préparation extemporanée

VI. Solution de 4-chloromercuribenzoate de sodium

. 4 chloromercuribenzoate (Fluka)	1,13 g
. Soude N q.s.p. dissoudre environ.....	10 ml
. Chlorure de sodium (Merck).....	0,85 g
. Eau distillée.....q.s.p..	100 ml

Conservation à +4°C

VII. Réactif colorant

. Dihydroxy-3,5 toluène (Prolabo).....	3,10 g
. Glucuronolactone (Prolabo)	2,24 g
. Dioxo-2-3 butane (Fluka).....	0,21 g
. Chlorure de sodium (Merck)	4,25 g
. Eau distillée q.s.p.	500 ml

Préparation extemporanée ou congélation par fractions

VIII. Soude 1,5 N

IX. Solution stock de créatine 0,01 M

. Créatine anhydre (Merck).....	0,1311 g
. Eau distillée.....q.s.p.	100 ml

** Diagramme des flux

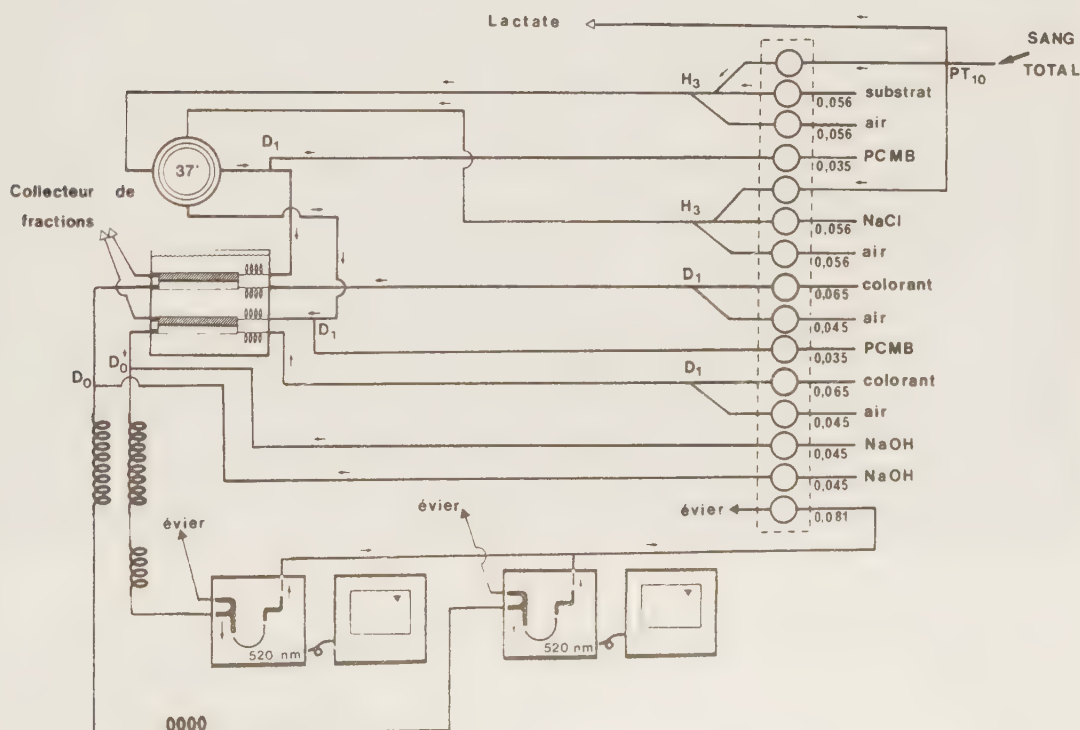


Figure 9 : Mesure de l'activité de la CPK en continu. Diagramme des flux.

A la sortie du catheter veineux, le flux sanguin est séparé en trois parties :

- deux sont envoyées dans des circuits parallèles synchrones permettant d'effectuer simultanément un essai à blanc sans substrat et le dosage de l'activité enzymatique avec substrat.

- la troisième permet de recueillir 14 fractions de sang sur lesquelles nous avons dosé le lactate.

Le débit du tube de prélèvement est adapté au niveau de repos de l'activité de la CPK pour chaque sujet testé (à l'aide des 5 ml de sang prélevés avant le début de l'épreuve).

Les liquides éliminés par la dialyse et contenant les érythrocytes sont recueillis dans un collecteur de fractions. Chaque tube est centrifugé afin de vérifier l'hémolyse et leur activité enzymatique est testée.



Figure 10 : Mesure de l'activité de la CPK en continu in vivo. Vue générale du dispositif

** Etalonnage

Il est réalisé à l'aide de solutions de créatine allant de 0,05 à 1 mmol/l. (figure 11)

L'étalonnage est effectué au début et à la fin de chaque expérimentation afin de corriger la dérive éventuelle du système.

La valeur utilisée pour calculer l'activité enzymatique est la moyenne des deux gammes d'étalonnage.

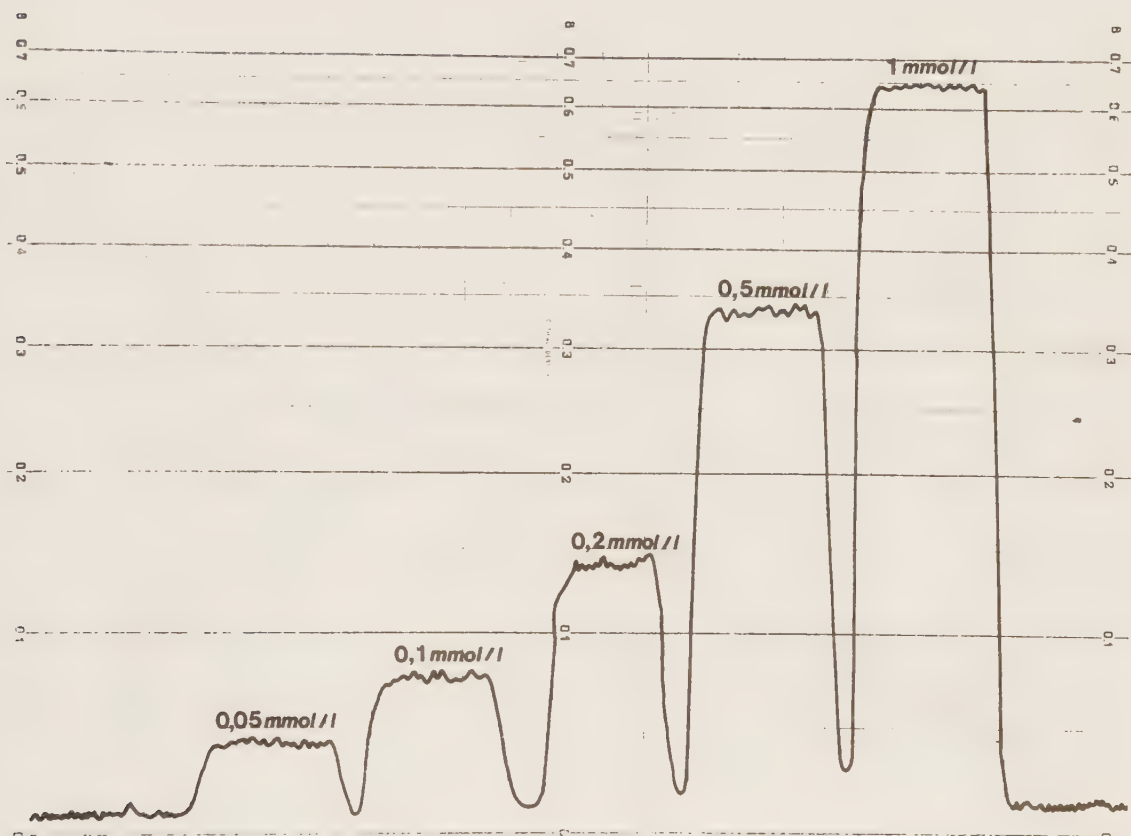


Figure 11 : Mesure de l'activité de la CPK en continu : gamme d'étalonnage

** Reproductibilité

Elle a été réalisée sur 10 échantillons d'une solution de créatine 0,5 mmol/l.

Le coefficient de variation (6,5 %) est acceptable.

4.2. RESULTATS ET DISCUSSION

Sur les cinq sujets testés, seules trois expérimentations sont utilisables. En effet, par deux fois, le catheter s'est bouché et l'épreuve a dû être interrompue.

4.2.1. VARIATIONS DE L'ACIDE LACTIQUE

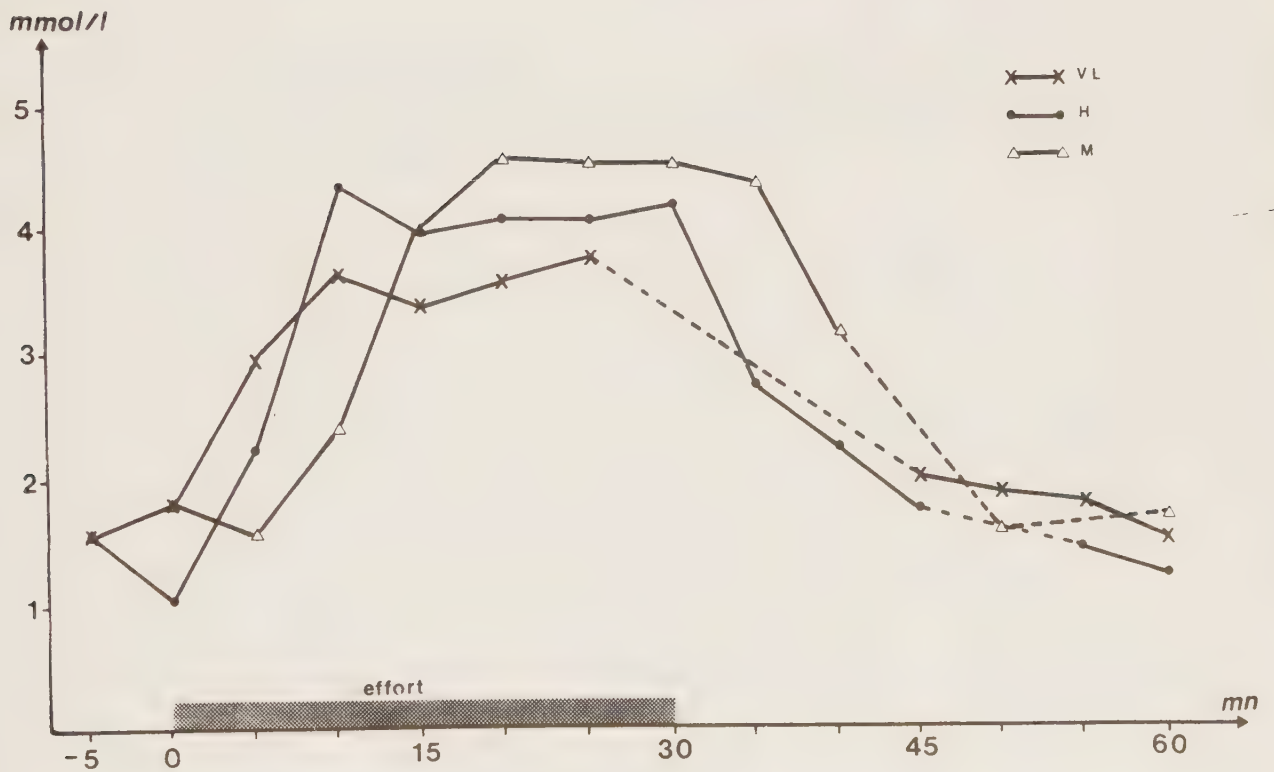


Figure 12 : Variations du lactate sanguin chez 3 sportifs au cours d'une épreuve d'effort de 30 min et de 30 min de récupération.

L'effort se traduit par une augmentation rapide du lactate sanguin dont le niveau se trouve multiplié par un facteur de trois environ. Dès la fin de l'épreuve, le taux de lactate redescend rapidement pour revenir à sa valeur au repos après 30 min de récupération.

Ces résultats s'accordent avec les données de la littérature ; en effet, tous les auteurs admettent une augmentation du taux de lactate sanguin au cours de l'effort (18, 40, 78, 79, 215, 216). Comme de L'ANNE et coll. (18) nous obtenons une variation maximale après un certain délai (5 min pour ces auteurs, 10 min pour nous) puis une stabilisation et enfin un retour au niveau de départ après 30 min de récupération. L'augmentation du lactate est fonction de l'intensité de l'effort (78, 79, 215) et du degré d'entraînement des sujets (217).

Nous avons effectué ce dosage afin de nous assurer que l'effort, bien que non exhaustif, était suffisant pour provoquer des modifications appréciables.

4.2.2. VARIATIONS DE LA CPK

La figure 13 rassemble les courbes obtenues pour les trois sportifs exprimées en mU/ml

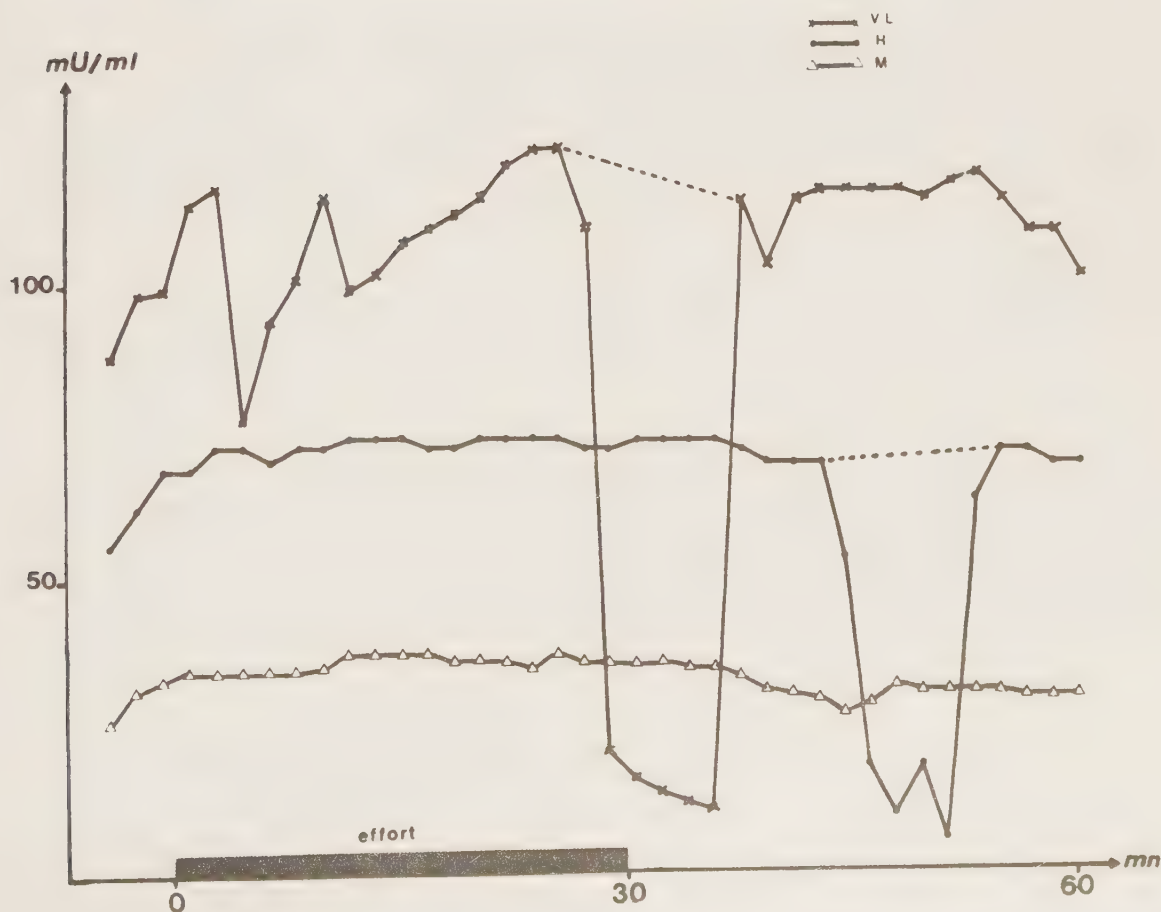


Figure 13 : Variations de la CPK chez trois sportifs au cours d'une épreuve d'effort de 30 min puis de 30 min de récupération

Quelques "accidents" dus à l'obturation du cathéter entraînent des perturbations importantes. Ces "accidents" sont inévitables. Ils ont d'ailleurs peu d'importance puisque très brusques, l'interruption du prélèvement étant instantanée. Il conviendrait de les corriger par des calculs. C'est ainsi qu'a procédé FREUND (205). En fait, ils influent peu sur le tracé général de la courbe et comme nous ne disposions pas du matériel nécessaire, nous avons préféré "négliger" ces perturbations lorsque c'était possible et éliminer les expérimentations au cours desquelles l'interruption était trop longue.

Selon les sujets testés, le niveau de la CPK varie énormément. Il est multiplié par trois d'un individu à l'autre.

Sur l'ensemble de l'épreuve, il n'y a pratiquement pas d'augmentation de l'activité enzymatique. Il y a cependant une légère tendance à l'augmentation au début puis une diminution à la fin de l'épreuve. Cependant les différences sont trop faibles pour être exploitables surtout sur trois sujets.

Ces résultats contredisent ceux que nous avons précédemment trouvés. Il faut toutefois remarquer que dans l'étude citée au chapitre III, les sportifs sont des footballeurs n'ayant aucune habitude du travail sur cycloergomètre alors que les trois athlètes traités ici sont des étudiants en éducation physique rompus à tous les sports. Le niveau de départ était très élevé et pourrait correspondre à un "état permanent de sortie d'enzymes".

Une autre hypothèse peut être retenue : ces trois sportifs sont très entraînés et l'effort pratiqué n'est pas suffisant pour provoquer une libération de la CPK.

Enfin, certains auteurs ont trouvé que l'augmentation maximale n'avait pas lieu aussitôt après un effort prolongé mais se produisait le lendemain (105, 128). De même, NUTTALL et JONES (218) ont observé un "pic" dans l'activité de la CPK 20 à 25 heures après un exercice aux haltères. Enfin, HARALAMBIE (219) a observé ce même phénomène chez des sujets non entraînés. Après entraînement, le "pic" est beaucoup plus faible.

Cette expérimentation originale n'a donc pas donné les résultats escomptés et mérite d'être refaite avec des sujets moins entraînés et un effort plus intense. La phase de récupération observée doit être plus longue (par des prélèvements successifs).

Cependant, elle nous a permis de mettre au point une méthode originale de mesure en continu in vivo de l'activité de la CPK.

Enfin, les différences d'activités au départ chez les trois sportifs très entraînés montrent bien que les variations inter individuelles sont importantes. D'autres travaux (132) chez les sujets non entraînés l'ont confirmé. La complexité des mécanismes de régulation physiologique et hormonale est donc un obstacle à l'étude simple sans isotopes du turnover des enzymes plasmatiques et du phénomène de sortie des enzymes cellulaires.

En conclusion de la première partie, nous avons mis en évidence que même un effort d'intensité limitée entraîne des variations de certains paramètres biologiques, soit des substrats comme le glucose veineux, ce qui est logique, soit des produits du métabolisme, modifiés par l'exercice (lactate, pyruvate...), soit enfin des enzymes plasmatiques.

La cause de l'augmentation des enzymes dans le compartiment sanguin est un problème difficile à approcher parce que de nombreux mécanismes peuvent être mis en cause. Si une augmentation de la synthèse peut pratiquement être exclue, restent comme causes possibles :

- . soit un ralentissement de l'excrétion ou du catabolisme de ces protéines dans le plasma,
- . soit des modifications du passage des enzymes du secteur cellulaire vers le secteur plasmatique.

C'est ce dernier mécanisme général qui est le plus probable et cette sortie de protéines peut elle-même être due à des facteurs métaboliques, physiologiques (hypoxie, déficit en ATP par exemple), mécaniques (contractions, mise en mouvement des masses musculaires) ou biochimiques (effets directs des ions ou des substrats). Ces facteurs enfin sont sous la dépendance des régulations nerveuses ou hormonales et de l'équilibre nutritionnel en particulier vitaminique.

Ce bref aperçu de la complexité des mécanismes successifs pouvant être responsables de l'augmentation des enzymes plasmatiques démontre que, dans ce domaine également, il faut simplifier ou utiliser des modèles in vitro pour tenter de comprendre les phénomènes en cause.

C'est pourquoi, nous voulons aborder à un échelon moins complexe que l'homme ou l'animal entier l'étude de la sortie des enzymes cellulaires.

----- DEUXIEME PARTIE -----

L'étude des phénomènes de "sortie" d'enzymes, c'est-à-dire du passage du compartiment cellulaire vers les secteurs plasmatique ou extracellulaire peut être abordée à différents niveaux de complexité in vitro.

Ont déjà été utilisés dans un ordre de complexité décroissante des organes, des cellules ou des organites cellulaires isolés :

Organes isolés ou perfusés

- . Foie (140, 167, 220)
- . Coeur (188, 202, 221, 222, 223, 224, 225)
- . Muscle (152, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233)
- . Muqueuse gastrique (234)
- . Pancréas (145, 235)

Coupes, fragments tissulaires, ponction biopsie

- . Coupes (223, 236, 237, 238, 239)
- . Fragments tissulaires (169, 240)
- . Biopsies (170)

Cellules isolées

- . Erythrocytes (144, 241, 242)
- . Leucocytes (144, 145, 146, 242, 243)
- . Thrombocytes (148, 149, 150, 242, 244, 245)
- . Cellules en culture (246)
- . Spermatozoïdes (247)

Organites subcellulaires

- . Mitochondries (248, 249, 250, 251)
- . Lysosomes (162, 181, 193, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262)
- . Microsomes (263, 264)

Sur ces différents systèmes, quels sont les procédés permettant de mettre en évidence des décrochements ou des sorties d'enzymes ?

Tout d'abord, les contractions importantes d'un muscle isolé provoquent une sortie d'ALD plus importante que celle obtenue avec un muscle au repos (152). La LDH ne sort d'un coeur perfusé avec différents milieux qu'à la reprise des contractions (202, 225). Par contre, la stimulation électrique seule, n'entraîne ni libération des enzymes du muscle de poulet (233), ni augmentation de la sortie de LDH des coupes de neurohypophyse (265).

Les conditions du milieu dans lequel est plongée la préparation tissulaire interviennent ensuite. La température de perfusion ou d'incubation agit sur la sortie des enzymes qui est retardée par diminution de la température (226, 251, 266). Cependant la température de 20°C est préférable à celle de 37°C pour la libération de certaines enzymes (140). Le pH a son importance. La libération est augmentée par abaissement du pH (251, 266) mais dans ce cas il se produit vraisemblablement des atteintes importantes des membranes et la viabilité du tissu ou de l'organe étudié est compromise. La force ionique du milieu baignant conditionne aussi la sortie des enzymes qui augmentent avec l'osmolarité (266). Cependant d'après DE LEIRIS et coll. (188), la LDH d'un coeur n'est pas libérée par perfusion d'un milieu hypertonique. Les ions présents dans les milieux agissent cependant par eux-mêmes sur la libération des enzymes. Une élévation du taux de potassium augmente la sortie de LDH du coeur (188, 202) et de l'ALD des muscles (226, 227, 228, 231) mais non de la LDH de coupes de neurohypophyse (265). La perfusion d'un pancréas isolé avec une solution dépourvue de calcium diminue la sécrétion d'amylase (235). Un coeur perfusé avec une solution sans calcium ni magnésium montre une sortie accrue de LDH lorsque la perfusion est reprise avec une solution normale (225). En ce qui concerne les anions, la sécrétion de la chitinase d'une muqueuse gastrique isolée diminue si on remplace les ions chlorures par des ions sulfates (234). L'EDTA provoque une sortie de LDH proportionnelle à la concentration en agent chélateur (202).

Le maintien du métabolisme cellulaire en particulier énergétique est également un facteur important. L'addition de glucose diminue la sortie d'ALD du muscle (226, 228, 232) alors que l'injection intraveineuse de glucose ou de fructose chez le lapin se traduit par une augmentation immédiate de la β glucuronidase sérique (267). L'hypoxie, comme dans les essais in vivo, est capable de faire sortir des enzymes in vitro. Ceci a été mis en évidence par les travaux de ZIERLER sur le muscle isolé (226, 228, 232) et de DE LEIRIS et coll. sur le coeur (188, 202). L'hormone antidiurétique ne modifie pas la sécrétion de la chitinase (234). L'insuline augmente la perméabilité des muscles à l'aldolase (225, 232) ainsi que l'ACTH (225).

Enfin, les traitements drastiques comme la congélation-décongélation, l'addition de substances naturelles ou non ou encore de détergents provoquent la sortie d'enzymes. Ainsi un cycle congélation et décongélation préalable d'un muscle isolé entraîne un accroissement de la sortie en fonction de la vitesse de congélation (233). La vitamine A détermine une libéra-

tion des hydrolases acides des lysosomes après incubation de 2 h (250). Sans incubation, ce phénomène n'a pas lieu. Les flavonoïdes (vitamine P) stabilisent les lysosomes et empêchent la sortie de cathepsine (257). Les anthocyanosides actifs in vivo sont sans action in vitro. De nombreux médicaments ont aussi été utilisés pour faire sortir des enzymes. Certains de ces composés comme les vitamines, le diméthylsulfoxyde, certains corticoïdes agissent différemment selon leur concentration. Une forte dose est destructrice alors qu'une dose faible stabilise les structures membranaires (241). Enfin, il y a une augmentation légère de la sortie des enzymes du muscle de poulet isolé sous l'influence du dodécylsulfate de sodium et de la phospholipase C alors que le désoxycholate n'a pas d'action (233). Certains toxiques en particulier des toxines et venins de serpent provoquent la libération d'enzymes de coupes de foie, muscle et encéphale (236).

En résumé, tous ces facteurs peuvent être regroupés selon leurs mécanismes d'action possible.

. On a longuement considéré la nécrose des cellules comme responsable de la sortie des enzymes. Cette hypothèse a été avancée pour justifier l'efflux d'enzymes se produisant lors d'un effort exhaustif. Comme preuve, ALTLAND et coll. (98) ont pu mettre en évidence des cellules nécrotiques dans les fibres musculaires striées. Dans des travaux plus récents, ces auteurs rapportent que ces fibres nécrotiques constituent seulement une partie minime des fibres totales et ne sont observées que dans des cas rares (52). De plus, pour obtenir la nécrose d'un tissu par action d'une substance, il faut appliquer des doses très fortes, non physiologiques. Un effet au niveau membranaire peut également expliquer l'action de toute une série d'agents.

- . Il peut y avoir atteinte directe des membranes
 - par effet sur la partie protéique : enzymes protéolytiques (trypsine, immunsérums (243)
 - par effet sur la partie lipidique : enzymes lipolytiques, détergents, solvants chlorés (268, 269), vitamines (253, 261, 262), froid, congélation-décongélation, peroxydation.
 - par action sur le système AMPc (243)

. Une atteinte des mécanismes énergétiques nécessaires au maintien de l'intégrité membranaire est aussi possible :

- l'ATP, nécessaire à la stabilité des membranes (241, 255) est abaissé après injection de tétrachlorure de carbone. Les inhibiteurs métaboliques bloquant la synthèse d'ATP (CO, fluoroacétate, dinitrophénol) augmentent la sortie des enzymes (170, 270, 271). L'anoxie, l'hypoxie interviennent également. Les groupements thiols (-SH) agissent aussi (186, 187, 255, 272).

. Les facteurs modifiant le métabolisme intracellulaire peuvent également intervenir indirectement sur la synthèse de composés nécessaires au maintien des structures : glucose (169, 226), lactate (273), potassium (202, 227, 274), anions et cations (144), force ionique (266), température (266), protéines du milieu extracellulaire (231, 240).

. Un effet au niveau des transporteurs membranaires peut encore se produire sous l'action d'ions bivalents (225, 244) ou de certains médicaments.

. Enfin, il est possible que des modifications des liaisons protéine-protéine intracellulaires soient responsables de la "sortie" des protéines. Nous avons avancé cette hypothèse récemment (275, 276, 277).

L'objet de ce travail est donc en partie de vérifier cette hypothèse originale.

Nous avons successivement utilisé des procédés d'extraction, des cellules musculaires dissociées puis des muscles entiers maintenus en survie pour tester l'effet des ions, de certains substrats pouvant être modifiés par l'effort.

Nous avons effectué des comparaisons avec des produits tels que le Triton ou des médicaments actifs au niveau membranaire.

Mais auparavant, il était nécessaire de préciser les valeurs de référence des enzymes musculaires des rats utilisés.

VALEURS DE REFERENCE DES ENZYMES ET ISOENZYMES DU MUSCLE GASTROCNEMIEN DE RAT



Avant d'entreprendre l'étude de la sortie des enzymes musculaires, il nous est nécessaire de définir le contenu enzymatique des muscles que nous utiliserons. En premier lieu, un relevé bibliographique des activités enzymatiques et isoenzymatiques des muscles squelettiques de rat a été effectué. Le niveau des activités enzymatiques des tissus est comme dans le plasma soumis à l'influence de nombreux facteurs que nous avons examinés. Enfin, après avoir défini nos conditions d'extraction et de dosage (temps de broyage, reproductibilité), les activités de diverses enzymes et isoenzymes du gastrocnémien ont été mesurées chez des rats de souche Sprague-Dawley et Wistar.

5.1. LES ENZYMES MUSCULAIRES CHEZ LE RAT : CONTENU ET VARIATIONS INTER ET INTRA- INDIVIDUELLES

Le tableau XV regroupe les activités trouvées dans la littérature pour l'ALD, la CPK, la MDH, la GOT, la GPT et la LDH dans le muscle de rat.

La comparaison des résultats est très difficile, même impossible. Les rats sont de souches différentes, leur poids varie beaucoup (100 à 500 g) les muscles utilisés sont très divers (gastrocnémien, biceps, quadriceps...) Comme nous le verrons plus loin, ces facteurs sont importants et font varier la composition enzymatique des muscles. Le problème qui est le plus important reste cependant celui des unités utilisées pour exprimer les activités enzymatiques.

TABLEAU XV : ALD, CPK, MDH, GOT, GPT et LDH DU MUSCLE SQUELETTIQUE DE RAT

Réf	AUTEUR	ANNEE	RACE	POIDS (g)	MUSCLE	ALD	CPK	MDH	GOT	GPT	LDH
278	HEARN	1957	Wistar	> 250	Gastrocnémien	51,3 ± 14,7%					
279	GOULD	1959			Biceps postérieur			5,1 ± 2,5 ^{MDH}			10,7 ± 4,0 ^{LDH}
280	HEARN	1959	Wistar	300		62,2 ± 8,7%					
281	RAWLINSON	1959	Wistar		Biceps postérieur		9800 ± 1600 ^{CPK}				
149	GOLLNICK	1967	Sprague-Dawley	244	Gastrocnémien						19,84 ^{LDH}
283	PETTE	1968			Quadriceps	8600°					28000°
182	NOVOSA-DOVA	1969	Wistar	160-180	Gastrocnémien						425,1 ± 12,9 ^{LDH}
248	BERG-MEYER	1970				55,6 ^{***}					
285	ERMINI	1970	Wistar	421 ± 29	Blancs Rouges		4,02* 2,85				
163	HOLLOSZY	1970	Wistar		Gastrocnémien			459 ± 20 ^{**}			
240	KARLSSON	1970	Sprague-Dawley					29,6 ^{***}			82,5 ^{***}
94	KENDRICK-JONES	1970		121 ± 4			407 ± 12,8 ^(x)				
286	SERBAN	1970							645 ± 75 ^{(x)(x)}		
287	DHALLA	1971		250-300	Patte arrière			17,7 ± 1,55 ^{(x)(x)}			7,0 ± 0,2 ^{(x)(x)}
288	DOTY	1971	Sprague-Dawley	350-400	Rectus femoris						130 ± 1,0 ^d
289	HOLLOSZY	1971	Wistar		Gastrocnémien						676 ± 42 ^{**}
290	OSCAI	1971	Wistar		Gastrocnémien		1150 ± 56 ^{**}				
291	SERBAN	1971		220	Gastrocnémien			41,45 ± 2,86 ^{AA}			
292	CRABTREE	1972	Wistar		Quadriceps femoris						448,0 ^{AA}
293	ERMINI	1972	Wistar	403 ± 119	Blancs Rouges	180 ± 78,7 ^{AAA} 144 ± 36,4					
294	KNOX	1972				16,95 ^{**} (6,7 - 22,7)	51,30 ^{**}	0,96 ^{**} (0,90-1,00)	0,72 ^{**} (0,40-1,03)	0,21 ^{**} (0,16-0,24)	1,04 ± 0,46 ^{**}
295	OREVI	1972				400 ^A					

Expression des résultats

:: mm³ de sol. de F I-6 diP / g pds f. / h à 38°C
 :::: U / mg d'N₂ non collagénique
 ::::: Δt° DO / min / mg / d'N₂
 ° μM subs. transf. / g pds f. / h à 25°C
 °° mU / ml
 °°° U / g pds f.
 °°°° mM de P / g pds f. / min.
 °°°°° μM / min / g pds f. à 30°C
 °°°°° U / mg pds f.

(x) μg de C / mg H₂ / min
 (x) (x) μg de pyruvate / mg prot.
 (x) (x) (x) μM / min / mg prot.
 A U / mg prot.
 ΔΔ μM / pdt formé / min / g pds f. à 25°C
 ΔΔΔ μM / mg prot. / 10 min / 38°C
 A nM / min / mg prot.
 AA μg de pyruvate / mg tissu

Les techniques étant différentes, les unités utilisées (17 différentes) n'ont aucun lien. Par exemple, pour la LDH, les valeurs vont de 1,04 $\mu\text{mol/min/g}$ de muscle frais à 30°C (294) à 28 000 $\mu\text{mol/h/g}$ de muscle frais à 25°C (283).

Devant l'impossibilité d'utiliser ces valeurs d'activité enzymatique musculaire, nous avons dû procéder à leurs déterminations pour avoir, dans les essais suivants, la valeur correspondant à l'activité maximale (100 %). Mais les différences observées peuvent aussi être dues à des variations intra et interindividuelles que nous allons examiner.

5.1.1. SEXE

Ce facteur est très important du fait des différences de masses musculaires et adipeuses entre mâles et femelles.

5.1.2. AGE

Chez le rat, l'ALD augmente énormément ($\times 10$) entre la naissance et l'âge adulte (296). TAUCHI et coll. (297) ont observé une diminution du poids du muscle avec l'âge. Le mécanisme entraînant la perte de poids est différent selon le type de fibres. Il s'agit d'une diminution soit du volume des fibres, soit de leur nombre.

5.1.3. NUTRITION

Le jeûne, tout d'abord, modifie le niveau des enzymes tissulaires (162). De même, dans le gastrocnémien de rat, la restriction alimentaire ne provoque pas de modification de l'ALD et de la PK. Par contre, la MDH, la LDH entre autres, diminuent de 20 à 50 % pour revenir à la normale en sept jours (298). Mais au cours des déficits alimentaires, les rats nagent plus longtemps et les enzymes respiratoires restent élevées (299).

5.1.4. VITAMINES

Dans le muscle squelettique rouge et blanc, on retrouve un taux de CPK inférieur chez les animaux carencés en vitamine C alors que l'ALD musculaire n'est pas influencée par ces conditions (64). De plus, les vitamines C et E entraînent une diminution du poids et du contenu en protéine du muscle (300). Enfin, une carence en vitamine E se traduit par une diminution des teneurs en créatine phosphate et en ADP (287).

5.1.5. FROID

L'adaptation au froid diminue la masse musculaire (177), augmente la vascularisation (301) et le niveau de certaines activités enzymatiques tissulaires : succinate déshydrogénase, cytochrome oxydase (302, 303), glucokinase (153).

Mais le tissu musculaire n'est pas seul en cause. Certains organes augmentent de taille, comme le foie et de contenu (MDH)(304). De nombreux métabolismes sont perturbés par le froid (néoglucogénèse et synthèse du cholestérol augmentées, métabolisme de l'UDP glucose modifié avec comme conséquences atteintes de la biosynthèse des glucuronides et de la vitamine C).

Mais souvent ces modifications ne sont dues qu'à l'augmentation de la prise de nourriture.

5.1.6. EFFORT - ENTRAINEMENT - ACTIVITES PHYSIQUES

5.1.6.1. Effet d'un exercice isolé

Du point de vue tissulaire, les études sont encore peu nombreuses. Cependant, quelques enzymes ont été mesurées dans le muscle squelettique avant et après un exercice. Ainsi par exemple, l'ATPase qui ne subit aucune variation dans le muscle d'animaux entraînés ou non, à la suite d'une épreuve de nage de 5 min, voit son activité significativement augmentée après une épreuve de 30 min (282). L'activité de la glycogène synthétase (totale ou de la forme I) n'est pas augmentée après un exercice unique ni dans les fibres rouges, ni dans les fibres blanches (88). L'hexokinase, au contraire, est augmentée aussi bien dans les muscles rouges que dans les muscles blancs aussitôt après 30 min de course épuisante chez les animaux non entraînés (89, 90). Cette augmentation est encore apparente 48 h après la fin de l'effort. En ce qui concerne la CPK, les résultats sont contradictoires. Certains auteurs ne trouvent aucune variation de cette enzyme musculaire (281, 290), alors que d'autres la voient augmenter (94). Dans le muscle de grenouille isolé et stimulé électriquement, il se produirait aussi une augmentation de la CPK selon KENDRICK-JONES et PERRY (94). Cependant, OSCAI et coll. (290) n'ont pu obtenir ces résultats avec un protocole d'expérimentation très proche. Chez des animaux très jeunes, l'activité de l'ALD est presque doublée dans les muscles après 12 h d'exercice (94). Enfin, la LDH musculaire est diminuée dans le muscle après un effort exhaustif (288). La diminution continue, même après l'effort, et le plus grand déficit s'observe 3 h après la fin de l'épreuve. De plus, le muscle lui-même et ses mitochondries subissent des perturbations à l'effort, plus ou moins admises par certains auteurs. Ainsi GOLLNICK et KING (305) montrent qu'une épreuve épuisante de course produit un gonflement des fibres musculaires et des mitochondries alors qu'une nage épuisante n'entraîne aucun changement. En revanche, TERJUNG et coll. n'ont trouvé aucune anomalie des mitochondries, ni dans le muscle (306), ni dans le coeur (307). Les perturbations des mitochondries sont fonction de l'intensité de l'effort (308).

Ainsi, le muscle subit un certain nombre de perturbations à l'effort exhaustif qui se traduisent le plus souvent par des augmentations des enzymes, sauf dans le cas de la LDH qui diminuerait. D'autres organes sont aussi impliqués dans la réponse à l'exercice.

Dans le coeur, il se produit après un effort exhaustif une augmentation significative de la glycogène synthétase (90) et une réduction de la LDH (288).

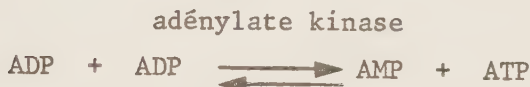
Dans le foie, ni la glucokinase, ni l'hexokinase, ni la glycogène synthétase ne sont significativement augmentées (90) et la LDH est diminuée de 15 % par rapport aux contrôles (288).

L'adaptation des organes à un effort aigu se traduit donc par une modification de leur composition intracellulaire. Il est vraisemblable que l'adaptation à l'effort chronique (ou entraînement) se fasse dans le même sens.

5.1.6.2. Adaptation à l'entraînement

Une revue très intéressante a fait le point sur l'adaptation enzymatique à l'entraînement du tissu musculaire (309). L'adaptation est différente selon le type de muscle (310).

Le système myofibrillaire s'adapte afin de restaurer les réserves en ATP selon deux voies possibles :



Les activités de l'adénylate kinase et de la CPK ne varient pas dans les muscles après un entraînement (281, 290). L'activité de l'ATPase, enzyme nécessaire à la scission de l'ATP, source d'énergie de la contraction musculaire, n'est pas augmentée non plus selon certains (281, 290) alors que d'autres la trouvent supérieure dans le muscle entraîné (66).

Les systèmes glycogénolytique et glycolytique conduisent à la resynthèse de l'ATP utilisé dans l'exercice. Il se produit un accroissement de la vitesse d'utilisation du glucose et du glycogène et les enzymes doivent être capables de suivre ce rythme. Ainsi l'activité de l'hexokinase soluble double avec l'entraînement, dans le muscle (89, 90, 91, 289, 311, 312). Il se produit, à la suite d'un entraînement intensif, une "surcompensation" se traduisant par un accroissement du contenu en glycogène musculaire (313). Il y a, en même temps, une augmentation de l'activité de la glycogène-synthétase du muscle (88, 314). D'autres enzymes de la glycolyse musculaire ont été étudiées : phosphorylase (279, 289, 311, 312, 315), phosphoglucomutase (311), glucose 6 phosphate déshydrogénase (311), phosphofructokinase (237, 289, 312), ALD (278, 312), PK (289, 312), et LDH (93, 279, 289, 312). En général, les auteurs s'accordent à ne trouver aucune variation significative de ces enzymes après entraînement dans les muscles, sauf en ce qui concerne la phosphorylase que certains disent augmentée (279, 311, 315) alors que pour d'autres elle ne varie pas (289, 312).

Le cycle de KREBS et la phosphorylation oxydative fournissent eux aussi de l'ATP grâce à l'intervention d'un certain nombre d'enzymes. Les enzymes testées augmentent toutes à l'entraînement (163, 164, 165, 299, 310, 317, 318, 319) ainsi que les cytochromes a, b et c (66, 92).

Le système transporteur d'O₂ dans le muscle est lui aussi adapté à l'entraînement grâce à l'augmentation de la myoglobine (309). Les résultats précédents semblent donc montrer un accroissement de la synthèse protéique, ce qui a d'ailleurs été mis en évidence récemment (309).

Comme le muscle, les autres organes s'adaptent à l'effort de longue durée. Ainsi, les protéines sont augmentées dans le muscle cardiaque (278, 316), le rein et le foie (320) ainsi que l'activité de certaines enzymes : ALD, LDH, glycogène synthétase (90, 278, 316) et d'autres ne varient pas, en particulier cytochrome oxydase, succinate oxydase, citrate synthase et MDH mitochondriale (68, 321).

Ainsi, l'effort et l'entraînement produisent des augmentations des enzymes tissulaires. De plus, l'entraînement augmente la densité des tissus (166). Il est donc logique de retrouver plus d'enzymes dans le plasma des animaux ou de sujets entraînés.

5.1.7. ANOXIE - HYPOXIE - ALTITUDE

Les enzymes tissulaires, cardiaques (322) ou musculaires (323) sont augmentées par séjour prolongé en altitude ou par hypoxie. Par contre, une anoxie aigüe de quelques minutes se traduit par une diminution de la SDH et la LDH dans de nombreux organes (324).

5.1.8. HORMONES

Les hormones thyroïdiennes, administrées à des animaux produisent une augmentation très nette des enzymes tissulaires (65, 153). La GOT musculaire est plus élevée après injection d'androgènes (325).

5.1.9. TOXIQUES - MEDICAMENTS

Le tétrachlorure de carbone, en dehors de son action sur le foie, provoque une augmentation de la GOT musculaire (291). Le cortisol potentialise son action.

Enfin, en dehors de ces facteurs physiologiques, le contenu enzymatique varie considérablement selon les muscles (326, 327) : "les muscles blancs" ont un métabolisme plutôt anaérobie alors qu'il est aérobie dans les "muscles rouges" (64, 88, 154, 160, 318, 319). Il y a également des différences dans les concentrations en substrats en particulier le créatine phosphate (161).

Tous ces exemples sont destinés à montrer que pour obtenir des résultats reproductibles et comparables, il faut opérer dans des conditions très standardisées afin d'éliminer au maximum les facteurs de variations.

5.2. ESSAIS PERSONNELS

5.2.1. MATERIEL ET METHODES

5.2.1.1. Méthodes analytiques

Activités enzymatiques globales

Elles ont été mesurées par les méthodes précédemment décrites (chapitre III).

Activité des isoenzymes

Les isoenzymes sont séparées par électrophorèse sur bande de Cellogel puis une coloration spécifique de l'enzyme est développée et la lecture est effectuée par densitométrie.

Isoenzymes de la MDH et de la GOT

Nous avons utilisé pour les isoenzymes musculaires les mêmes techniques que celles employées pour les isoenzymes hépatiques à l'iodonitrotétrazolium violet pour les isoenzymes de la MDH et au fast violet B (6-benzamido-4-méthoxy-m-toluidine, chlorure de diazonium) pour les isoenzymes de la GOT (330).

Isoenzymes de la LDH

La technique de BINETTE (331) a été employée. Cependant nous avons apporté une modification. Le remplacement du "nitro blue tetrazolium" (NBT) préconisé par les auteurs par "l'iodonitrotétrazolium violet" (INT) évite les dépôts de colorant qui gênent lors de la lecture densitométrique des électrophorèses.

Dosage des protéines

Nous avons dosé soit les protéines totales par la méthode de LOWRY modifiée (332), soit les ions ammonium formés après minéralisation des protéines. L'ammonium est dosé par la réaction de Berthelot à l'aide d'un autoanalyseur selon la technique de ASSOUS, DREUX et GIRARD (333). L'étalonnage est réalisé avec de l'albumine bovine (°).

5.2.1.2. Matériel biologique

Animaux

Nous utilisons des lots de rats mâles de sept semaines, souche Sprague Dawley (°°). Leur poids est de 200 à 240 g.

Les animaux sont isolés dans des cages métalliques à lavage automatique. L'eau est fournie "ad libidum" par l'intermédiaire d'un système d'abreuvoir automatique à valve. Ils reçoivent 25 g d'aliment complet pour rat (°°°) sous forme de "bouchons" contenant 16,8 % de matières azotées totales, 2,7 % de matières grasses et 59,4 % de glucides. L'animalerie est thermostatée à 22°C et les animaux sont soumis à un cycle de 10 h de lumière artificielle fluorescente et 14 h d'obscurité.

Prélèvements

Après un jeûne de 8 h, les rats sont décapités à l'aide d'une guillotine entre 9 h 00 et 9 h 30. Toutes les opérations sont effectuées à +4°C. Les deux muscles gastrocnémiens sont prélevés le plus rapidement possible, débarrassés des masses adipeuses et rincés par deux fois par une solution refroidie de chlorure de sodium à 0,9 % pour éliminer le sang et les poils éventuellement présents.

5.2.1.3. Préparation des broyats

Les solutions utilisées pour l'extraction de l'ALD de muscle sont excessivement variées. Des solutions tampons de Tris (hydroxyméthylamino-méthane) sont, en général, préconisées (296, 334, 335, 336, 337) auxquelles sont ajoutées de l'EDTA (334, 335), du β mercaptoéthanol (296).

(°) Fraction V Sigma, référence 12659

(°°) Elevage des Oncins - Saint Germain sur l'Arbresle 69210 L'ARBRESLE

(°°°) UAR, 7 rue du Maréchal Gallieni, Villemoisson sur Orge 91360 EPINAY SUR ORGE - Aliment n° A04

Nous avons pour notre part employé

- une solution de Krebs-Ringer bicarbonatée, pH 7,4 (KRB) (338) pour avoir un milieu de composition plus proche des milieux physiologiques
- et une autre solution ionique de composition suivante :
 - . Mannitol 300 mmol
 - . Chlorure de potassium 10 mmol
 - . TRIS (hydroxyméthylaminométhane)... 10 mmol
 - . Phosphate monopotassique..... 5 mmol

Ajuster à pH 7,4 par de la potasse ou de l'acide phosphorique

Influence du temps de broyage

Ces essais ont été réalisés en utilisant comme solution d'extraction le milieu KRB. Après séchage rapide sur papier filtre, chaque gastroc-némien prélevé est coupé en deux morceaux exactement pesés.

Chacun de ces fragments musculaires est coupé en petits morceaux et introduit dans un tube de polyéthylène à fond rond (16,2 mm de diamètre, 76 mm de longueur). 4 volumes de la solution d'extraction (v/w) refroidie sont ajoutés dans chaque tube qui est alors plongé dans la glace pilée.

Après broyage^o, les tubes sont centrifugés pendant 20 minutes à 5000 g dans une centrifugeuse réfrigérée Janetzki K 24.

Les surnageants sont décantés puis amenés aux dilutions convenables à l'aide d'une solution de chlorure de sodium à 0,9 % et dosés.

Nous avons testé sept temps de broyage (tableau XVI). Entre chacune des périodes de broyage, un arrêt de 10 s est observé afin de limiter au maximum les phénomènes d'échauffement.

TABEAU XVI : INFLUENCE DU TEMPS DE BROYAGE SUR L'EXTRACTION DES ENZYMES ET DES PROTEINES DU GASTROCNEMIEN DE RAT ($\bar{m} \pm 2s$)

TEMPS	ALD (U/g muscle frais)	LDH (U/g muscle frais)	PROTEINES (μ gN/g muscle frais)
3 x 10 s	88,9 $\pm$ 12,4	195,0 $\pm$ 12,4	7,0 $\pm$ 0,90
4 x 10 s	88,0 $\pm$ 22,6	185,3 $\pm$ 51,2	7,3 $\pm$ 1,96
5 x 10 s	77,3 $\pm$ 44,4	180,0 $\pm$ 16,0	7,0 $\pm$ 2,16
6 x 10 s	96,3 $\pm$ 15,6	202,1 $\pm$ 40,6	7,5 $\pm$ 2,08
3 x 20 s	88,9 $\pm$ 30,4	167,3 $\pm$ 74,2	7,1 $\pm$ 1,98
4 x 20 s	97,5 $\pm$ 23,2	196,0 $\pm$ 68,2	7,7 $\pm$ 0,40
5 x 20 s	68,1 $\pm$ 48,0	168,8 $\pm$ 45,8	6,8 $\pm$ 0,70

^o Ultra Turrax TP 10/N vitesse maximale

Les meilleurs résultats sont obtenus avec le temps de broyage de 6 fois 10 s ou quatre périodes de 20 s. La première de ces durées donne des résultats moins dispersés, du moins pour les enzymes. C'est celle que nous utiliserons dans la suite de notre travail.

Reproductibilité de l'extraction

Pour la définir, six extractions des gastrocnémiens d'un rat ont été effectuées à l'aide de la solution à base de mannitol. Ces essais ont été réalisés sur quatre rats différents (n° I, II, III et IV).

Les résultats sont regroupés dans le tableau XVII. Ils sont exprimés en U/g de muscle frais pour les enzymes et en mg/g de muscle frais pour les protéines.

Les résultats sont acceptables. Les coefficients de variations sont de l'ordre de 6 à 7 % sauf pour la CPK où ils vont jusqu'à 12 % et la LDH où on atteint 15 et même 20 %.

En ce qui concerne les isoenzymes, les coefficients de variation sont satisfaisants lorsque les fractions sont quantitativement importantes. Ils deviennent trop élevés lorsqu'il s'agit d'une fraction faible. C'est ainsi, par exemple, que pour la GOT, le coefficient de variation passe de 4 % environ pour la fraction cytoplasmique (représentant environ 80 %) à 15 - 18 % pour la fraction mitochondriale (représentant 20 %). Ce phénomène est identique pour les isoenzymes de la LDH et même amplifié.

La séparation des isoenzymes demande beaucoup de précautions. Les reproductibilités étant mauvaises, nous avons effectué chaque essai en double. De plus, chaque électrophorèse est lue par densitométrie deux fois. En effet, l'erreur sur la lecture pour la GOT par exemple atteint déjà 5 %.

TABEAU XVII : ACTIVITES ENZYMATIQUES GLOBALES ET PROTEINES TOTALES
REPRODUCTIBILITE DE L'EXTRACTION (moyennes, écarts-type
et coefficients de variation)

		I	II	III	IV
ALD	$\bar{m}$	85,9	78,3	60,1	81,4
	s	7,7	3,1	3,0	3,3
	CV	9,0	4,0	5,0	4,0
CPK	$\bar{m}$	3574,4	4104,0	2880,0	2624,0
	s	253,8	291,4	230,4	314,9
	CV	7,1	7,1	8,0	12,0
MDH	$\bar{m}$	373,1	337,3	379,7	291,8
	s	26,1	13,5	15,2	17,5
	CV	7,0	4,0	4,0	6,0
LDH	$\bar{m}$	371,6	415,8	468,3	456,7
	s	55,2	23,4	67,3	116,0
	CV	14,9	5,6	14,4	25,4
GOT	$\bar{m}$	73,2	126,6	130,0	93,0
	s	2,2	5,1	6,5	5,6
	CV	3,0	4,0	5,0	6,0
GPT	$\bar{m}$	10,0	13,0	11,1	9,9
	s	0,64	0,65	0,76	0,70
	CV	6,4	5,0	6,8	7,1
PROTEINES	$\bar{m}$	50,8	41,6	41,6	48,4
	s	3,0	1,2	2,0	4,4
	CV	5,9	2,9	4,8	9,1

5.2.2. RESULTATS ET DISCUSSION

Cette étude a pour but de définir dans nos conditions de travail l'activité des enzymes et isoenzymes du muscle gastrocnémien de rat. Ces essais ont été réalisés sur douze rats. Deux souches, Sprague-Dawley et Wistar ont été comparées.

Les résultats des activités enzymatiques globales exprimés en U/g de muscle et des protéines (en mg/g de muscle) sont regroupés dans le tableau XVIII pour la souche Sprague-Dawley et dans le tableau XIX pour la souche Wistar.

TABEAU XVIII : ENZYMES ET PROTEINES DU GASTROCNEMIEN DE RAT DE SOUCHE SPRAGUE-DAWLEY (résultats en U ou en mg/g de muscle frais).

RAT N°	ALD	CPK	MDH	LDH	GOT	GPT	PROT.
1	47,8	2944	173,3	332,5	58,0	15,2	41,5
2	49,4	2786	204,8	430,0	80,0	13,2	42,0
3	79,6	3210	258,9	425,0	93,5	14,0	46,0
4	66,1	2692	338,7	332,5	83,0	14,0	36,5
5	74,2	2786	378,0	342,5	87,5	12,4	53,0
6	79,5	2007	291,9	340,0	108,5	11,2	39,0
7	95,2	2787	310,6	320,0	74,5	11,2	45,5
8	90,5	2738	277,6	317,5	85,0	11,6	47,0
9	98,1	3378	358,3	245,0	84,0	10,8	38,0
10	98,1	3378	349,0	360,0	108,0	10,4	36,7
11	91,5	3098	227,4	305,0	66,5	14,0	37,2
12	88,6	3321	291,9	252,5	52,0	14,0	35,5
m	79,9	2927	288,4	333,5	81,7	12,7	41,5
s	17,6	389	63,7	55,7	17,4	1,6	5,4
CV	22,0	13,3	22,1	16,7	21,3	12,5	13,0

TABEAU XIX : ENZYMES ET PROTEINES DU GASTROCNEMIEN DE RAT DE SOUCHE WISTAR
(résultats exprimés en U ou en mg/g de muscle frais)

RAT N°	ALD	CPK	MDH	LDH	GOT	GPT	PROT.
1	88,8	3265	195,9	490,0	73,6	10,0	35,5
2	84,5	3440	191,0	490,0	73,0	8,0	37,0
3	72,4	3265	287,0	430,0	92,0	11,2	39,0
4	73,3	3236	236,3	515,0	63,5	10,0	37,0
5	65,6	3482	277,6	420,0	58,0	9,6	35,5
6	74,1	3409	291,9	535,0	64,5	10,8	39,5
7	87,7	3908	245,1	410,0	83,0	10,8	41,0
8	91,4	3348	315,0	390,0	83,2	10,8	38,0
9	87,7	3374	328,8	400,0	74,4	11,6	40,0
10	92,3	3462	409,6	420,0	86,6	11,2	37,5
11	88,6	3675	353,4	437,5	80,0	10,8	39,0
12	84,0	3562	311,1	462,5	66,0	8,4	39,0
$\bar{m}$	82,5	3451	286,9	450,0	74,8	10,3	38,2
s	8,9	192,2	63,6	47,5	10,4	1,1	1,7
CV	10,8	5,6	22,2	10,6	13,9	10,7	4,5

Les activités enzymatiques globales dans les deux souches sont très comparables. Cependant la dispersion est moins importante avec les rats de souche Wistar qu'avec la souche Sprague-Dawley. Les rats Wistar dans ce cas précis étaient de la même fratrie, ceci est la seule différence entre les deux expérimentations.

Les tableaux XX et XXI donnent les résultats obtenus pour les isoenzymes respectivement pour les rats de souche Sprague-Dawley et Wistar.

TABLEAU XXI : ISOENZYMES DU GASTROCNEMIEN DE RATS SPRAGUE-DAWLEY
(Séparation par électrophorèse - Résultats exprimés en %)

Rat N°	MDH		GOT		LDH				
	(-)mito	cyto(+)	(-)mito	cyto(+)	(+) I	II	III	IV	V (-)
1	65,6	34,4	37,2	62,8	2,4	4,0	6,2	15,7	71,7
2	77,4	22,6	25,3	74,7	4,0	7,8	10,0	25,2	53,0
3	56,7	43,3	24,7	75,3	6,1	7,4	9,7	20,2	56,6
4	53,7	46,3	27,5	72,5	3,3	5,4	9,8	20,9	60,6
5	53,0	47,0	28,0	72,0	3,9	5,8	9,8	20,7	59,8
6	58,0	42,0	22,0	78,0	2,9	4,3	6,0	15,4	71,4
7	56,1	43,9	26,3	73,7	3,4	5,6	8,5	19,5	63,0
8	56,3	43,7	18,1	81,9	4,8	7,5	8,6	18,9	60,2
9	60,7	39,3	28,3	71,7	1,7	2,5	4,1	19,0	72,7
10	58,1	41,9	19,1	80,9	2,0	5,6	9,0	21,6	61,8
11	70,8	29,2	29,1	70,9	1,4	2,4	4,3	16,9	75,0
12	60,6	39,4	30,0	70,0	1,7	5,9	7,6	16,6	68,2
$\bar{m}$	60,6	39,1	26,3	73,7	3,1	5,3	7,8	19,2	64,5
s	7,3	7,3	5,1	5,1	1,4	1,8	2,1	2,8	7,1
C.V.	12,0	18,5	19,5	7,0	45,1	33,4	27,6	14,7	11,0

TABLEAU XXI : ISOENZYMES DU GASTRONECMIEN DE RATS WISTAR
(Séparation par électrophorèse - Résultats exprimés en %)

Rat	MDH		GOT		LDH				
	(-) mito	cyto (+)	(-) mito	cyto (+)	(+) I	II	III	IV	V (-)
1	58,8	41,2	22,5	77,5	1,7	2,2	3,7	17,5	74,9
2	51,9	48,1	29,3	70,7	2,1	3,7	5,4	18,4	70,4
3	52,0	48,0	31,1	68,9	2,2	5,4	5,3	17,2	69,9
4	53,0	47,0	27,0	73,0	1,5	2,8	4,0	16,5	75,2
5	55,6	44,4	21,8	78,2	2,1	4,4	7,5	16,8	69,2
6	57,4	42,6	12,4	87,6	1,7	4,6	7,5	25,9	60,3
7	74,7	25,3	31,8	68,2	1,0	2,7	5,6	17,9	72,8
8	75,1	24,9	29,3	70,7	1,4	1,8	3,9	16,2	76,7
9	76,2	23,8	29,0	71,0	1,4	2,5	5,9	14,4	75,8
10	71,0	29,0	33,6	66,4	2,0	3,5	7,1	20,9	66,5
11	75,3	24,7	27,2	72,8	1,4	3,1	6,2	17,5	71,8
12	76,7	23,3	34,3	65,7	1,3	3,4	7,2	20,2	67,9
$\bar{m}$	64,8	35,2	27,4	72,6	1,6	3,3	5,8	18,3	70,9
s	10,7	10,7	6,1	6,1	0,4	1,1	1,4	2,9	4,7
C.V.	16,5	30,4	22,3	8,4	25,0	33,3	24,1	15,8	6,6

Pour les isoenzymes de la MDH, quatre fractions dont deux importantes ont été mises en évidence par O'PHER et coll. (339) dans le muscle humain. Pour notre part, seules deux fractions ont pu être révélées et quantifiées chez le rat. Cependant sur certaines électrophorèses, deux bandes de très faible intensité sont parfois visibles mais non mesurables par densitométrie.

Pour les isoenzymes de la GOT, SERBAN (291) obtient une valeur un peu plus élevée de la fraction mitochondriale (33,8 % contre 26,3 et 27,4 % suivant les souches de nos rats). KÖRMENDY et coll. (340) ont trouvé des fractions cytoplasmiques et mitochondriales identiques dans le muscle de porc.

En ce qui concerne les isoenzymes de la LDH, nous obtenons une fraction V plus faible que celle trouvée habituellement chez le rat : 94 % pour HEINZ (341), 90 % pour WIELAND et coll. (342) et 85 % chez le rat (100) ou le lapin (343) alors que chez la souris, la fraction V ne représente que 47 % de la LDH du muscle (344).

Ces différences ne sont pas très importantes lorsqu'on se souvient de la reproductibilité très médiocre des électrophorèses des isoenzymes. Aucun de ces auteurs ne donne d'ailleurs la reproductibilité de sa technique.

+ + +

En résumé, ces résultats sont indispensables pour définir les valeurs de référence dans nos conditions opératoires. Ils nous permettront, dans la suite de notre travail, de fixer le 100 % d'activité auquel nous pourrions comparer nos résultats.

Cette étude nous a aussi permis de définir les conditions standard dans lesquelles il faut garder les animaux afin de réduire les variations inter et intraindividuelles. Elle nous a servi également de témoin pour une étude des variations enzymatiques au cours d'essais de déplétion et réplétion par quatre protéines différentes (345) que nous ne présentons pas ici.

Nous pouvons maintenant aborder les problèmes de décrochement d'enzymes et de sortie.

"DECROCHEMENT", EXTRACTION ET "SOLUBILISATION" DES ENZYMES ACTION DE DIFFERENTS FACTEURS

Les enzymes se trouvent dans les cellules en général sous forme de complexes avec d'autres enzymes, des protéines inertes, des acides nucléiques, des polysaccharides ou des lipides. Même celles qui se trouvent en solution vraie dans le cytoplasme sont probablement associées en agrégats moléculaires. En conséquence, afin d'extraire les enzymes, il est nécessaire de les dissocier des autres molécules. Bien que la dispersion des agrégats moléculaires puisse souvent être exécutée mécaniquement, la dissociation de nombreux complexes enzymatiques demande des forces chimiques spécifiques. Les méthodes chimiques doivent être adaptées au type de liaison auquel participe l'enzyme. Les forces électrostatiques, les liaisons hydrogènes et les forces de VAN DER WAALS ont certainement une très grande importance alors que les liaisons de coordination et de covalence semblent moins fréquentes. Au regard de cette complexité, il est normal que de nombreuses méthodes empiriques d'extraction des enzymes des cellules animales aient vu le jour. Cependant, le développement des connaissances concernant la localisation cellulaire, la nature chimique et l'environnement lipidique des enzymes, rend maintenant possible une approche plus rationnelle de la solubilisation des protéines douées d'activité enzymatique et détermine les méthodes d'extraction à utiliser dans chaque cas particulier.

D'une façon générale, il est possible de faire entrer les enzymes dans l'un ou l'autre des groupes suivants (346) :

1 - Enzymes en solution vraie dans le cytoplasme, c'est-à-dire restant dans le surnageant après élimination complète de toutes les particules d'un homogénat. L'éclatement des cellules dans un tampon adéquat libère en général de telles enzymes dans le milieu de dispersion.

2 - Enzymes contenues dans des organites cellulaires (lysosomes, mitochondries...)

3 - Enzymes associées à des structures cellulaires, c'est-à-dire liées au noyau, aux mitochondries, aux microsomes, ou à l'appareil de Golgi. Ces enzymes peuvent sembler en solution grâce à la présence de l'organite ou de la membrane à laquelle elles sont liées.

4 - Enzymes membranaires intimement associées à du matériel lipoprotéique insoluble.

Certains facteurs conditionnent la solubilité d'une protéine et agissent en modifiant sa charge électrique ou son degré d'hydratation ou encore en la faisant participer à une réaction chimique qui modifie légèrement sa structure sans changer son activité enzymatique. Ces facteurs vont être utilisés pour extraire les enzymes. Il peut s'agir de moyens physiques comme l'utilisation de différents types de broyeurs (347), de cycles de congélation-décongélation (163, 348), de variations de température (349), d'ultra sons (163, 348, 350, 351, 352), de solvants organiques (349, 353, 354, 355, 356, 357), d'enzymes comme la trypsine (358) ou la ribonucléase (355), certains composés à groupements thiols comme le dithiothreitol (359)...

D'autres facteurs que nous allons examiner plus en détail sont aussi très importants dans l'extraction des enzymes. Ce sont en particulier le pH, la force ionique, la nature des ions, la présence de métabolites... Une comparaison avec les détergents a été effectuée.

6.1. MATERIEL ET METHODES

Les méthodes analytiques sont précédemment décrites (chapitre III) ainsi que la technique d'extraction (chapitre V). Tous nos résultats sont la moyenne d'au moins quatre essais. Ils sont calculés en pourcentages par rapport à des essais témoins qui varient selon le facteur étudié.

6.2. RESULTATS ET DISCUSSION

6.2.1. INFLUENCE DU pH

Elle a été étudiée dans un milieu de Krebs-Ringer bicarbonaté dont le pH a été amené à 6,2 - 6,8 et 7,4.

TABEAU XXII : INFLUENCE DU pH SUR L'EXTRACTION DES ENZYMES DU MUSCLE DE RAT

pH	ALD	CPK	LDH	GOT	PROT.
7,4	100	100	100	100	100
6,8	94,3	103,5	84,6	95,0	99,0
6,2	94,0	92,0	77,8	88,8	96,0

L'acidification du milieu provoque une diminution de l'extraction des enzymes. L'effet du pH est variable avec la protéine. En général, la solubilité des protéines est minimum au pH isoélectrique (357). Bien souvent, celui-ci est situé dans les valeurs acides et les protéines sont plus solubles aux pH alcalins (349). C'est ce que suggèrent nos résultats. Cependant, l'extraction des protéines totales n'est pas affectée par les variations de pH. Ces variations ont aussi peu d'action sur le comportement de l'ALD. In vitro, en solutions pures, cette enzyme est liée à la F-actine à 100 % à des pH variant de 6,2 à 7,0 (360). A pH 7,5, elle reste liée à 93,8 %. A des pH plus alcalins, la quantité d'enzyme liée diminue. Ainsi à pH 8,7, seuls 30 % de l'ALD de muscle restent attachés. Des enzymes douées de la même action catalytique peuvent être influencées différemment par un facteur comme le pH.

Ainsi, seulement 20 % de l'ALD de cerveau sont solubilisés à pH 6,0. La solubilisation atteint 60 % à pH 7,5 puis 80 % à pH 8,0 (361). Les sous-unités C₄, spécifiques du cerveau, seraient détachées préférentiellement aux pH bas. Le degré d'association augmente avec le contenu en sous-unités A. A pH 7,0, l'ensemble des sous-unités A est lié aux particules alors que les sous-unités C sont solubles.

Donc la composition en sous-unités des isoenzymes intervient dans les problèmes d'extraction. Plutôt que la composition, il semble d'ailleurs que ce soit la localisation intracellulaire des isoenzymes qui intervienne. En effet, dans le cerveau, les cinq isoenzymes sont distribuées différemment entre membranes et cytosol. Les isoenzymes trouvées dans le cytosol sont plus riches en sous-unités C alors que les isoenzymes associées au matériel particulaire sont de type A (362). L'environnement intracellulaire joue aussi un rôle. Les réactions différentes des ALD musculaire et cérébrale sont vraisemblablement conditionnées par les grandes différences dans les taux de lipides de ces deux organes.

D'autres enzymes glycolytiques voient leur liaison à la F-actine très perturbée par les variations de pH. En particulier, 93 % de la LDH sont fixés à la F-actine à pH 6,5 alors qu'à pH 7,5 seuls 23 % le sont encore (360). La même tendance se manifeste dans nos résultats, les proportions étant différentes mais les conditions opératoires aussi. En effet, ARNOLD et coll. (360) ont utilisé des solutions purifiées de F-actine et d'enzyme.

Les résultats obtenus pour la CPK en fonction du pH sont contradictoires. A pH 6,8, l'extraction semble augmenter légèrement alors qu'à pH 6,2, elle diminue mais ces fluctuations sont faibles.

En ce qui concerne la GOT, l'abaissement du pH se traduit par une diminution nette de l'activité de l'enzyme dans l'extrait. La fraction cytoplasmique est très sensible à une acidification du milieu (363). Elle perd totalement son activité à pH 5,0. Nos résultats pourraient refléter cette inactivation.

Malgré ce problème de l'inactivation probable de la GOT, les résultats obtenus rendent bien compte de l'influence du pH sur le décrochement des enzymes liées.

6.2.2. INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE

Il existe une certaine dépendance entre le pH et la concentration en sels des milieux. A pH neutre, il faut des concentrations élevées en sel pour extraire les protéines. Une molarité en chlorure de sodium de l'ordre de 0,15 permet généralement l'extraction des enzymes. Cependant, certains complexes enzymatiques ne peuvent être dissociés que par des concentrations bien supérieures en sels (NaCl 0,5 à 2 mol).

Lorsque le milieu solvant ne contient pas du tout d'ions (force ionique nulle), il ne peut y avoir d'atmosphère ionique autour de la molécule protéique. Celle-ci se présente comme une sphère chargée, placée dans un milieu diélectrique parfait. Le potentiel électrocinétique est maximum à la surface de la protéine puis décroît rapidement selon une loi linéaire. Il en résulte que deux molécules protéiques peuvent s'approcher à courte distance et s'agglomérer : la solubilité est faible. Il n'existe pas de couches ioniques adhérente ou diffuse. Lorsqu'on ajoute des ions à faible concentration, les couches ioniques adhérente et diffuse sont bien formées. Elles sont épaisses ainsi que la couche d'hydratation. La distance minimale d'approche est grande et la solubilité est meilleure. Lorsque la force ionique devient élevée, la solubilité diminue rapidement parce qu'il se produit un amincissement de l'atmosphère ionique et qu'une forte interaction se développe entre les ions minéraux et les molécules d'eau, ce qui entraîne une diminution de la tension interfaciale.

Pourtant l'eau distillée peut parfois être aussi efficace qu'une solution saline (349). Elle fait éclater les structures mais les sels sont nécessaires pour détacher les enzymes (364).

TABEAU XXIII : INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE SUR L'EXTRACTION DES ENZYMES DE MUSCLE DE RAT

	ALD	CPK	LDH	PROT.
Eau distillée	100	100	100	100
NaCl 0,154 mol	147	134	104	128
NaCl 0,500 mol	139	123	106	147

L'augmentation de la force ionique provoque une solubilisation accrue des enzymes et des protéines. L'ALD en particulier est extraite en grande quantité par du chlorure de sodium 0,154 mol. Cependant l'action de la force ionique est limitée puisque lorsqu'elle augmente, l'activité enzymatique du surnageant a tendance à diminuer. La liaison ALD-F-actine diminue avec l'augmentation de la concentration en chlorure de potassium (365, 366). Ce phénomène de désorption sous l'influence de la force ionique serait du type coopératif.

Si on utilise une solution de force ionique faible ($I = 0,025$) lors de la première extraction de l'ALD de muscle de lapin, les sels endogènes sont suffisants pour libérer la plus grande partie de l'enzyme mais au cours d'une deuxième extraction, la force ionique tombe si bas qu'il n'y a plus d'ALD extraite. Pour solubiliser la totalité de la protéine, il faut un tampon de force ionique élevée ($I > 0,2$). Aucune différence fondamentale n'a pu être mise en évidence entre les enzymes extraites à force ionique faible et élevée (367).

Comme dans le cas des variations de pH, les sous-unités C_4 de l'ALD d'encéphale sont libérées à des forces ioniques inférieures à celles indispensables pour solubiliser les sous-unités A_4 (361).

La CPK se retrouve aussi en grande quantité dans les extraits dont la force ionique est élevée. Si ce phénomène est facilement explicable pour l'ALD qui est liée, l'interprétation est plus difficile pour la CPK. En effet, cette enzyme est en grande partie cytoplasmique. Seule une faible fraction est mitochondriale. Elle ne semble pas liée, ou du moins ses liaisons éventuelles n'ont pas été mises en évidence.

L'augmentation de la force ionique a peu d'influence sur l'extraction de la LDH. Seule une faible fraction supplémentaire est solubilisée. Cette enzyme a été longtemps considérée comme cytoplasmique. En fait, elle est partiellement associée à différentes particules subcellulaires (368, 369), mais ses liaisons sont lâches et un broyage complet est suffisant pour les rompre.

Enfin, les protéines sont extraites en quantité d'autant plus importante que la force ionique augmente.

Un autre exemple de l'importance de l'addition de sels au milieu solvant est illustré par le fait qu'une solution ionique comme un milieu de Krebs-Ringer bicarbonaté (338) est plus solubilisante que l'eau distillée.

TABEAU XXIV : INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE SUR L'EXTRACTION DES ENZYMES

	ALD	CPK	LDH	GOT	PROT.
Eau distillée	100	100	100	100	100
KRB	132	105	101	108	112

Il se produit une augmentation importante de l'extraction de l'ALD et des protéines. La CPK, la LDH et la GOT sont peu affectées par l'addition de ces sels. La nature des ions a donc aussi un rôle important puisque deux solutions de même force ionique (NaCl 0,154 mol et KRB) n'ont pas le même effet.

6.2.3. INFLUENCE DE LA NATURE DES IONS

Les cations métalliques jouent un rôle de première place dans les processus biologiques (370). En dehors du fait qu'ils sont transporteurs de charges, catalyseurs d'oxydo-réduction, activateurs ou inhibiteurs de certaines enzymes (371), actions qui ne nous intéressent pas ici, d'autres effets ont été clairement mis en évidence. En particulier, ils sont stabilisateurs des structures (372) capables de provoquer des dissociations de sous-unités enzymatiques, efficaces sur la stabilisation de certaines enzymes liées. De toutes ces propriétés, seules nous intéressent celles ayant trait au "décrochement" des enzymes.

Les liaisons électrostatiques et hydrogènes peuvent être dissociées par les sels. Les cations monovalents et les anions multivalents sont les plus efficaces. Lors de l'extraction des enzymes de cellules animales, le pouvoir solvant des ions diminue selon les ordres suivants : (349)

- . cations : lithium, potassium, sodium
- . anions : à pH neutre ou alcalin : pyrophosphate, borate, phosphate, sulfocyanure, carbonate acide, iodure, chlorure
à pH acide : citrate, acétate

Effet des cations

Le pouvoir solvant des ions calcium et magnésium a été comparé. Au cours de l'effort, ces deux cations bivalents subissent des variations. Ils ont tendance à augmenter (19), mais leurs fluctuations sont de faible amplitude et mal connues. Elles pourraient cependant expliquer en partie l'augmentation des enzymes plasmatiques à l'effort.

Nous avons utilisé les solutions suivantes de force ionique environ 0,17

1. Eau distillée
2. Chlorure de sodium 0,171 mol
3. Chlorure de sodium 0,154 mol
Chlorure de magnésium 0,005 mol
4. Chlorure de sodium 0,034 mol
Chlorure de magnésium 0,046 mol
5. Chlorure de sodium..... 0,154 mol
Chlorure de calcium 0,005 mol
6. Chlorure de sodium 0,034 mol
Chlorure de calcium 0,046 mol

TABEAU XXV : INFLUENCE DE LA NATURE DES IONS SUR L'EXTRACTION DES ENZYMES

SOLUTIONS D'EXTRACTION	ALD	CPK	LDH	PROT.
Eau distillée	100	100	100	100
NaCl 0,171 mol	116	109	109	115
NaCl 0,154 mol MgCl ₂ 0,005 mol	123	123	115	120
NaCl 0,034 mol MgCl ₂ 0,046 mol	124	104	112	101
NaCl 0,154 mol CaCl ₂ 0,005 mol	104	86	103	96,5
NaCl 0,034 mol CaCl ₂ 0,046 mol	94,5	78	99,5	92

Le magnésium ajouté à faible concentration a un effet solubilisant important sur les enzymes et les protéines. A dose élevée, son action diminue nettement sauf sur l'ALD dont l'extraction est faiblement augmentée. Par contre, le calcium aux mêmes concentrations est sans action solvante. Au contraire, certaines activités sont diminuées, en particulier la CPK. Il y a vraisemblablement inhibition de l'enzyme.

Les acétates de calcium et de magnésium empêchent, à une concentration très faible, l'établissement d'une liaison ALD musculaire F-actine. De plus, ils ont un effet marqué sur la liaison déjà établie entre ALD et F-actine (365) Ils en provoquent la rupture et resolubilisent l'ALD. Ces mêmes cations empêchent la solubilisation de l'acétylcholinestérase et des protéines et ne libèrent que des quantités négligeables d'ATPase (373, 375).

Le calcium est plus efficace que le potassium sur l'extraction de l'ALD d'encéphale (361). L'actomyosine est complètement solubilisée par le magnésium à 1 mmol (374) mais la concentration en ion augmentant, la protéine devient beaucoup plus insoluble.

Les cations bivalents sont donc très actifs sur le "décrochement" des enzymes. Le sodium et le potassium ont aussi leur importance. Ils empêchent spécifiquement la solubilisation de l'acétylcholinestérase (373). Les chlorures de sodium et de potassium contribuent à la désorption de l'ALD d'un homogénat d'encéphale donc à la solubilisation de l'enzyme (361).

Enfin, l'action des cations est fonction de l'organe à traiter et de l'enzyme à extraire. Ainsi l'eau bidistillée à pH 6 est le milieu d'extraction de choix de la GLDH hépatique alors que pour l'ALD ou la LDH le meilleur solvant est une solution de chlorure de sodium additionnée d'EDTA (347).

Si la présence d'ions est importante, son absence joue aussi un rôle. Ainsi l'addition d'EDTA qui complexe certains cations influence le décrochement de certaines enzymes. Il est capable par exemple de libérer la NADH-déshydrogénase de ses complexes mais n'a aucun effet sur l'ATPase (376).

Pour tester cette action, nous avons ajouté de l'EDTA à une solution de Krebs Ringer bicarbonatée.

TABEAU XXVI : INFLUENCE DE LA NATURE DES IONS SUR L'EXTRACTION DES ENZYMES DU MUSCLE DE RAT : EFFET DE L'EDTA

	ALD	CPK	GOT	LDH	PROT.
K R B	100	100	100	100	100
+ EDTA 1 mmol	96	98	91	94	106
+ EDTA 20 mmol	89	94	98,5	95,2	96

L'addition d'EDTA provoque une diminution de l'extraction des enzymes. Ceci est logique si l'on se réfère à l'action de cations comme le magnésium qui augmentent l'extraction (tableau XXV) et au fait que l'EDTA complexe ce magnésium. L'action de l'EDTA est d'autant plus marquée que sa concentration augmente sauf en ce qui concerne la GOT pour laquelle il se produit une diminution puis une augmentation de l'activité lorsque le taux d'EDTA croît.

Effet des anions

Nous avons comparé l'action du chlorure et du phosphate de sodium. Les forces ioniques des solutions sont différentes, le phosphate étant fortement inhibiteur des réactions enzymatiques.

TABLEAU XXVII : INFLUENCE DE LA NATURE DES IONS SUR L'EXTRACTION DES ENZYMES DU MUSCLE DE RAT : EFFET DES ANIONS

	ALD	CPK	LDH	PROT.
Eau distillée	100	100	100	100
NaCl 0,154 mol	144	135	103	110
Na ₂ HPO ₄ 0,01 mol	159	140	102	109

Le phosphate est plus efficace que le chlorure sur l'extraction de l'ALD et à un degré moindre sur celle de la CPK. En ce qui concerne la LDH et les protéines totales, les deux anions ont des actions absolument comparables.

Le fait que les forces ioniques soient différentes a peu d'importance du moins sur la solubilisation de l'ALD puisque 2 mmol de phosphate ont la même action que 40 mmol de chlorure sur la désorption ALD-F-actine (365).

D'autres anions jouent un rôle très important. Les agents chaotropiques (sulfocyanures, perchlorates, iodures, nitrites...) sont capables d'agir en détruisant la "structure ordonnée" de l'eau et en augmentant son caractère lipophile. Ils entraînent ainsi un affaiblissement des liaisons hydrophobes des membranes et provoquent la rupture des liaisons entre protéines et lipides (377, 378). Or l'eau intracellulaire des muscles ou du cerveau semble posséder une structure plus rigide que l'eau extracellulaire (378). Leur action se traduit donc par des remaniements intracellulaires et décrochement des enzymes (264). L'urée et les guanidines ont le même effet.

D'autres ions demandent à être regroupés dans un chapitre particulier.

6.2.4. EFFET DES SUBSTRATS SPECIFIQUES, DES METABOLITES

La solubilité des enzymes peut être influencée par association aux substrats. On peut s'attendre à ce que la combinaison avec les coenzymes altère la distribution des charges sur la surface de la protéine. Donc il est parfois possible que l'addition de substrats ou de coenzymes puisse faciliter la dissociation des complexes enzymatiques ou l'extraction des enzymes. Par exemple, l'addition de β glycérophosphate empêche l'adsorption sur charbon animal de la phosphatase alcaline (349).

De même, une importante proportion de l'ALD extractible du muscle ou du cerveau est liée et l'addition de lactate influence de façon marquée sa liaison (273). Ce métabolite libéré en grande quantité au cours de l'effort pourrait être la ou l'une des causes de rupture ou dissociation des liaisons protéine-protéine "in vivo". L'étude de son action in vitro est donc intéressante et pourrait apporter des arguments en faveur de cette hypothèse.

Nous avons surchargé par deux concentrations en acide lactique (5 et 10 mmol) les solutions suivantes :

- . Eau distillée
- . NaCl 0,154 mol
- . NaCl 0,500 mol
- . Saccharose 0,25 mol Tris 0,01 mol

L'acide lactique a été amené à pH 7,4 de façon à ne pas acidifier les solutions.

TABEAU XXVIII : INFLUENCE DE L'ADDITION DE METABOLITES SUR L'EXTRACTION DES ENZYMES : EFFET DU LACTATE

SOLUTIONS D'EXTRACTION	ALD	CPK	LDH	PROT.
Eau distillée	100	100	100	100
+ Acide lactique 5 mmol	41,4	40,3	90,8	95,5
+ Acide lactique 10 mmol	92,3	56,7	71,4	102,5
NaCl 0,154 mol	100	100	100	100
+ Acide lactique 5 mmol	79,8		84,8	116,5
+ Acide lactique 10 mmol	61,8	28,3	62,3	78,5
NaCl 0,500 mol	100	100	100	100
+ Acide lactique 5 mmol	97,3	102	94,3	93,5
+ Acide lactique 10 mmol	98,8	94,3	93,8	92,3
Saccharose TRIS	100	100	100	100
+ Acide lactique 5 mmol	77,1	79,1	99,0	95,8
+ Acide lactique 10 mmol	90,3	31,8	89,6	120,2

L'addition d'acide lactique entraîne une diminution parfois importante de l'activité enzymatique. Certaines enzymes sont plus influencées que d'autres par addition de ce métabolite. La CPK en particulier, montre des variations contradictoires.

Ces résultats incohérents pourraient être expliqués par des fluctuations du degré d'extraction des enzymes. C'est pourquoi nous avons cherché à savoir si la totalité des enzymes était extraite et retrouvée dans le premier surnageant.

Pour celà, nous avons repris deux fois par une nouvelle quantité de solution d'extraction les culots de centrifugation. Nous avons ainsi obtenu les surnageants 2 et 3.

TABLEAU XXIX : INFLUENCE DE TROIS EXTRACTIONS SUCCESSIVES SUR LA SOLUBILISATION DES ENZYMES : EFFET DU LACTATE

SOLUTION D'EXTRACTION	Surna- geant	ALD	CPK	LDH	PROT.
Eau distillée	1	87,8	83,0	96,4	66,6
	2	6,0	13,8	2,7	21,0
	3	6,2	3,2	0,9	12,4
Saccharose Tris	1	88,6	82,9	83,5	65,3
	2	10,6	14,7	15,0	24,5
	3	0,8	2,4	1,5	10,2
Saccharose Tris + 5 mmol/l d'acide lactique	1	80,0	96,9	87,6	52,2
	2	18,1	2,7	12,3	22,8
	3	1,9	0,4	0,1	25,0
Saccharose Tris + 10 mmol/l d'acide lactique	1	91,2	89,3	96,9	40,1
	2	8,8	9,9	3,0	32,2
	3	0	0,8	0,1	27,7

La solution de saccharose-Tris permet d'obtenir une extraction complète de l'ALD dès la seconde extraction alors qu'avec l'eau distillée, il reste encore 6,2 % de l'activité enzymatique dans le troisième surnageant. L'extraction de la CPK et des protéines n'est pas influencée par l'addition de ces réactifs. Par contre, l'extraction de la LDH semble retardée. En effet, il n'y a plus que 83,5 % de l'activité totale dans le premier surnageant par rapport aux 96,4 % obtenus avec l'eau distillée.

L'addition d'acide lactique produit un retard de l'extraction de l'ALD, retard net surtout avec une concentration de 5 mmol. En ce qui concerne la CPK l'acide lactique à 5 mmol augmente l'activité enzymatique du premier surnageant mais une concentration de 10 mmol ne confirme pas ces résultats. Pour la LDH, en revanche, l'activité du premier extrait augmente avec la concentration en acide lactique.

L'acide lactique enfin entraîne une extraction totale des enzymes puisqu'on ne retrouve plus qu'une activité négligeable dans le troisième extrait.

En ce qui concerne les protéines, les résultats sont nettement différents. Le lactate provoque un retard dans leur extraction. Ce retard est d'autant plus marqué que la concentration en acide lactique augmente.

Ces résultats sont un contre-argument à l'hypothèse selon laquelle la sortie d'enzymes serait due à une rupture de certaines liaisons protéine-protéine intracellulaire.

L'action d'autres substrats a été testée sur la liaison ALD-F-actine. In vitro en solutions purifiées à une concentration de 0,1 mmol, le fructose 1-6 diphosphate, le glucose 1-6 diphosphate, le dihydroxyacétone-phosphate et le 2-3 diphosphoglycérate diminuent la liaison ALD musculaire-F-actine (365). Il faut une concentration de 1 mmol en fructose 1-6 diphosphate pour libérer l'ALD d'encéphale. Ici encore, intervient l'environnement lipidique. D'autres substrats (ADP, ATP, PEP) ont la même action sur la liaison ALD-F-actine à un degré bien inférieur. Enfin, le pyruvate, le lactate et l'AMP n'auraient aucun effet (365).

Ainsi l'action du lactate est controversée. Selon les uns, il favorise la désorption de l'ALD musculaire (273), selon les autres, il est sans action (365). Les conditions opératoires sont différentes mais ne sont pas suffisantes à expliquer ces divergences.

D'après nos résultats, l'action du lactate n'est pas nette et demande à être approfondie.

Lorsque les traitements précédents (variations de pH, addition de sels...) n'ont pas été suffisants pour "arracher" la protéine à ses structures, il est nécessaire de faire agir des composés spéciaux comme les détergents. Ils sont utiles, en général, pour des enzymes fermement liées aux membranes.

6.2.5. INFLUENCE DES DETERGENTS ET DES COMPOSES APPARENTES

Le terme détergents ou détersifs n'envisage que l'application commune de nettoyage. On leur préfère les termes d'agents de surface ou de "surfactifs" qui désignent les produits dans l'ensemble de leurs propriétés. Les termes de "tensioactifs" ou émulsionnants sont plus restrictifs.

La classification des surfactifs synthétiques repose essentiellement sur leur dissociation électrolytique. C'est ainsi que l'on distingue selon la nature du groupement polaire hydrophile :

- . les surfactifs anioniques qui comprennent les molécules organiques les plus diverses
- . les surfactifs cationiques qui comprennent essentiellement les ammoniums quaternaires
- . les surfactifs non ioniques qui présentent de grosses molécules dont une partie est lipophile et l'autre hydrophile
- . les amphotères.

Qu'ils soient naturels (comme les acides choliques) ou synthétiques, les détergents peuvent se combiner aux lipoprotéines et faciliter ainsi l'extraction des enzymes qui leur sont liées (351). Il semble que les liaisons électrostatiques et les forces de VAN DER WAALS soient impliquées dans la combinaison protéines-détergents et donc que la formation de ces complexes soit très dépendante des conditions de pH. Les détergents anioniques, par exemple, se fixent sur les groupements basiques des protéines et peuvent être utilisés à pH neutre ou alcalin. Dans de nombreux cas, il y a une relation stoechiométrique entre le détergent et la protéine et il faut de très petites quantités (0,001 à 0,01 mol) de détergent synthétique pour former des micelles stables (349).

Le Triton X 100 (octylphenoxy-poly-éthoxyethanol) est un détergent non ionique très utilisé.

Nous avons testé son action sur l'extraction des enzymes du muscle à la concentration de 1 ‰. (A des concentrations supérieures, les réactions enzymatiques se trouvent plus ou moins perturbées).

TABEAU XXX : INFLUENCE DES DETERGENTS SUR L'EXTRACTION DES ENZYMES DU GASTROCNEMIEN DE RAT : EFFET DU TRITON X 100 A 1‰.

	ALD	CPK	GOT	LDH	PROT.
K R B	100	100	100	100	100
K R B + Triton X 100 1 ‰.	120	148	108	104	105

Il se produit une solubilisation de toutes les enzymes. Cependant ALD et CPK sont les plus augmentées. Ceci est logique pour l'ALD qui est libérée de ses structures mais pour la CPK, le Triton X 100 provoque vraisemblablement une activation, bien que les essais de surcharge effectués ne l'aient pas mis en évidence. La LDH et la GOT sont peu influencées par ce détergent. Il en est de même pour les protéines totales. Pourtant, le Triton X 100 est capable de libérer 80 % des protéines et à peu près tous les phospholipides des membranes du reticulum sarcoplasmique (379).

A une concentration de 0,4 %, il n'y a plus que 15 % environ des protéines (malate déshydrogénase, succinate oxydase et protéines totales) et des phospholipides qui restent fixés aux mitochondries (351). Ce même Triton X 100 est capable de solubiliser 75 % et même 85 % de l'activité totale de la NADH oxydase des microsomes de foie (380). Il a aussi été employé pour solubiliser les protéines de membranes plasmiques de foie de rat (381). Son utilisation est préférable à celle d'urée ou d'acide acétique qui dénature certaines enzymes. Le Triton X 100 à 0,1 % sépare 25 à 33 % des protéines du sarcolemme du muscle squelettique. Il a encore été employé pour libérer l'hexokinase des thrombocytes (348), l'acétylcholinestérase des érythrocytes (382) ou des membranes plasmatiques (364).

En dehors du Triton X 100, d'autres détergents sont très utilisés en particulier le désoxycholate (350, 383, 384), le cholate (350)... Enfin, d'autres composés ont une action voisine de celle des surfactifs. Ce sont les toxines et venins de serpents contenant des phospholipases douées d'activité solubilisante (370), la digitonine (350)...

Il semble évident que toutes ces substances facilitant la solubilisation des protéines, ont une action sur leur stabilité. C'est ainsi, par exemple, que la glucose-6-phosphatase devient plus susceptible à la destruction thermique après traitement par le désoxycholate (355).

En résumé, l'ALD musculaire, fortement liée aux protéines de structure est libérée en grandes quantités par augmentation de la force ionique, par addition d'ions bivalents ou de détergents. L'acidification du milieu, la présence d'EDTA, chélateur des cations bivalents, entraînent une diminution de la "solubilisation" de l'enzyme. La GOT, en partie mitochondriale, est peu influencée par tous ces traitements. Le broyage en est vraisemblablement la cause. Il rompt toutes les structures et libère les enzymes qui ne sont pas liées très fortement. Les variations de la CPK qui n'est qu'en faible partie mitochondriale, sont en général parallèles à celles de l'ALD mais moins amples et parfois contradictoires. Cette enzyme est connue pour son instabilité qui perturbe vraisemblablement nos résultats.

L'action des sels, des détergents sur la solubilisation de la LDH est faible. Cette enzyme est associée à différentes particules subcellulaires mais ses liaisons sont lâches et le broyage en présence d'eau distillée suffit à les rompre.

Les résultats obtenus sont donc intéressants mais leur interprétation pose parfois quelques problèmes.

La technique d'extraction, très drastique, est donc d'utilisation délicate.

Ces résultats méritent d'être confirmés par des méthodes moins rudes, plus proches des conditions physiologiques. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude de la sortie des enzymes de cellules musculaires isolées maintenues en survie.

CHAPITRE VII

SORTIE DES ENZYMES DE CELLULES MUSCULAIRES ISOLEES MAINTENUES EN SURVIE



Avant d'entreprendre des essais de libération d'enzymes de cellules musculaires dissociées, il nous a fallu d'abord mettre au point les techniques de dissociation et de vérification de la viabilité. C'est pourquoi en premier lieu nous décrivons les techniques utilisées pour évaluer l'état morphologique et la viabilité des cellules. Différentes méthodes d'isolement des cellules sont ensuite comparées. Enfin, la libération de l'ALD, de la CPK et des protéines sous l'influence de différents facteurs est décrite.

7.1. ETAT MORPHOLOGIQUE ET VIABILITE DES CELLULES

Nous avons fait appel à l'examen microscopique, à une coloration vitale au bleu trypan et à la mesure de la consommation d'oxygène par les cellules.

7.1.1. EXAMEN MICROSCOPIQUE

Les culots cellulaires sont examinés entre lame et lamelle après coloration par une goutte de solution de lugol. Les cellules sont colorées en jaune brun. Les striations caractéristiques des fibres musculaires apparaissent nettement.

7.1.2. PERMEABILITE AU BLEU TRYPAN

Cette méthode est basée sur le fait que la membrane externe des cellules vivantes est capable d'exclure sélectivement certaines substances tandis que des cellules mortes permettent à ces substances de pénétrer très facilement à travers leur membrane (385). En utilisant des colorants, il est facile de distinguer au microscope les cellules perméables. Dans ce but, le bleu trypan est employé à la concentration de 0,1 % en solution dans du chlorure de sodium à 0,9 %.

7.1.3. RESPIRATION DES CELLULES

Elle a été testée par mesure polarographique de l'O₂ selon la technique décrite par ailleurs (363).

Après le dernier lavage, le culot des cellules est remis en suspension dans cinq fois son volume de milieu polarographique, 200 µl de cette suspension sont placés dans la cellule de mesure contenant 1,3 ml de milieu. La consommation d'oxygène des cellules est suivie à 25°C. Aucune mesure quantitative n'a été effectuée. Ce test n'a été utilisé que comme vérification de la viabilité des cellules.

7.2. ISOLEMENT DES CELLULES A PARTIR DE MUSCLE DE RAT ADULTE

Les procédés de dissociation tissulaire sont basés sur des traitements qui modifient les attaches intercellulaires de façon à libérer les cellules. Bien que de nombreuses substances soient capables d'affaiblir l'adhésion mutuelle des cellules, la dispersion complète des tissus avec un grand nombre de cellules vivantes est très difficile à obtenir (386).

Les matériaux intercellulaires sont différents selon les tissus envisagés. Ils peuvent aller des mucopolysaccharides à des protéines fibreuses et inclure dans les éléments protéiques ou glucidiques des sels inorganiques comme dans les os. Il faut donc s'attendre à ce que chaque tissu requiert un traitement spécifique pour sa désagrégation.

La plupart des procédures implique l'utilisation de traitements mécaniques, chimiques ou une combinaison des deux. Nous n'avons trouvé dans la littérature aucune technique utilisée pour le muscle adulte. Nous nous sommes inspirés de techniques utilisées pour d'autres tissus adultes ou pour des muscles d'embryons de poulet. Nous avons essayé en premier lieu, un traitement mécanique.

7.2.1. "PEIGNAGE" DU MUSCLE

Le muscle est "déchiré" dans le sens des fibres à l'aide de pinces ophtalmiques et d'aiguilles d'acier. La plus grande partie du tissu conjonctif est éliminée et les cellules obtenues sont lavées et leur viabilité testée.

L'examen microscopique montre que les contours des cellules sont nets et les stries apparentes. Leur viabilité, testée par coloration au bleu trypan ou consommation d'oxygène, est satisfaisante. Cependant, les eaux de lavages sont très riches en enzymes, ce qui prouve que de nombreuses fibres ont été abimées. Enfin, les tissus sont mal dissociés, les cellules restent accolées en faisceaux. Il est d'ailleurs connu que la désintégration des tissus par homogénéisation, coupe, tamisage, fournit en général des mélanges de cellules isolées et de faisceaux de cellules. Il se produit, de plus, l'éclatement de nombreuses cellules donc une perte importante. L'avantage principal d'une telle méthode de dissociation réside dans le fait que les cellules ne sont soumises à aucun traitement chimique. Cependant, la rupture mécanique peut aussi impliquer des effets plus complexes. Une variété de stimuli (386) dont les chocs mécaniques, cause une libération de calcium qui joue un rôle important dans les phénomènes de cohésion cellulaire. Il est donc difficile de distinguer les effets purement mécaniques des effets chimiques accompagnant de tels procédés.

L'isolement des cellules sous l'effet des ultrasons semble meilleure mais les conséquences des vibrations sur l'ultrastructure et les propriétés fonctionnelles des cellules sont encore mal connues et demandent à être recherchées.

Ces procédés mécaniques ne sont en général utilisés que comme première étape d'un traitement chimique. C'est ainsi que nous avons procédé. La dissociation mécanique a été utilisée avant l'application de deux traitements chimiques, l'un faisant appel à l'action de la trypsine, l'autre à celle de la collagénase.

7.2.2. TRAITEMENT A LA TRYPSINE

Le muscle est coupé en lanières dans le sens des fibres. Ces fragments musculaires sont mis en suspension pendant trente minutes à 37°C dans une solution de trypsine à 0,25 % dans du chlorure de sodium à 0,9 % (5 ml/g de tissu). L'agitation du milieu est effectuée par un barreau aimanté.

La suspension est ensuite filtrée sur plusieurs épaisseurs de gaze pour éliminer les fragments les plus importants. Le filtrat est centrifugé vingt minutes à 450 g en centrifugeuse réfrigérée. Le culot est ensuite lavé par trois fois avec une solution refroidie de Krebs-Ringer bicarbonatée pH 7,4.

Nous avons fait varier le temps de trypsination. Les cellules ont été examinées après cinq, dix, quinze, vingt et trente minutes de traitement. Le temps de trente minutes est le seul capable de produire une désagrégation importante du tissu. Jusqu'à vingt minutes d'action de la trypsine, les cellules restent associées en faisceaux.

Nous avons aussi utilisé différents procédés d'agitation, différentes concentrations de trypsine. La température a été abaissée jusqu'à 30°C. Dans chacun des cas, la viabilité et l'état morphologique ont été contrôlés.

L'examen microscopique révèle que les cellules sont très peu nombreuses et que leurs contours ne sont pas nets. Elles sont très digérées. Les stries caractéristiques des fibres musculaires n'apparaissent plus. Leur viabilité semble compromise. En effet, les cellules sont perméables au bleu trypan et sont donc "mortes". Enfin, leur consommation d'oxygène est très faible voire nulle.

Dans notre cas, le traitement à la trypsine s'est donc révélé inadéquat. Pourtant la trypsine est l'enzyme la plus employée pour désagréger les tissus. La trypsine purifiée semble plus efficace pour séparer les cellules de cultures établies que pour désintégrer les tissus frais (387). Lorsqu'elle est utilisée dans ce cas, les cellules ont tendance à s'accoler les unes aux autres. Cependant par digestion trypsique, on a pu isoler des cellules de surrénales (338), de rein (388, 389), de coeur (390), de thymus, de poumon (386) ou de muscle (391). Dans la plupart de ces études, la viabilité et la conservation des caractères histologiques des cellules isolées ont été démontrées. Pourtant certains tissus en particulier ceux d'animaux adultes sont réfractaires au traitement trypsique à cause de leur forte teneur en collagène. Ceci est, sans doute, une des raisons pour lesquelles il est si difficile d'obtenir des cellules isolées à partir de tissus adultes.

La grande quantité de collagène du muscle nous a fait utiliser la collagénase pour dissocier ces fibres. D'ailleurs, par un traitement à la collagénase, RODBELL (392) a isolé des cellules adipeuses, HINZ et SYVERTON (393) ont préparé des cellules pulmonaires, KARLSSON et coll. (240) ont obtenu des cellules mammaires.

7.2.3. TRAITEMENT A LA COLLAGENASE

Après "peignage" les fragments musculaires débarrassés au maximum du tissu conjonctif sont traités pendant trente minutes à 37°C par 50 ml/g de tissu, du mélange suivant :

. Collagénase °	0,02 g
. Albumine bovine °°	4,00 g
. Solution de Krebs-Ringer bicarbonatée.....	q.s.p. 100 ml

Le milieu est agité lentement dans un agitateur rotatif New-Brunswick. Après trente minutes de digestion enzymatique, les morceaux sont lentement aspirés et refoulés à travers une pipette afin de terminer la dispersion des masses cellulaires puis filtrés sur gaze stérile. Le filtrat est centrifugé à 600 g pendant quatre minutes. Les cellules sont lavées deux fois à l'aide de la solution de Krebs-Ringer bicarbonatée.

La viabilité des cellules ainsi préparées est testée.

Ce traitement après peignage conduit à l'obtention de cellules à peu près isolées, à bords nets et à stries très visibles. Par coloration vitale, les cellules semblent vivantes. Leur consommation d'oxygène est importante. aussitôt après leur préparation (figure 14).

° Boehringer Mannheim France

°° Albumine bovine F.V, Sigma

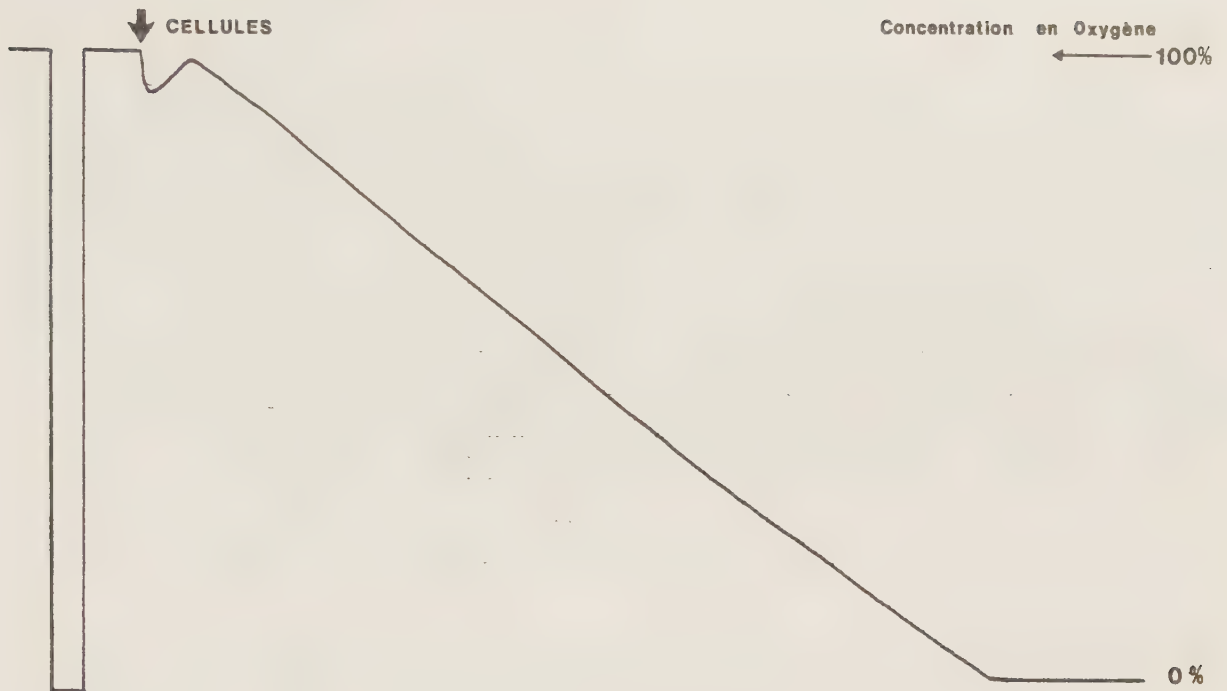


Figure 14 : Mesure polarographique : Contrôle respiratoire de cellules musculaires dissociées.

Ces cellules devant être utilisées pour des essais de sortie d'enzymes effectués à 37°C pendant deux à trois heures, nous avons testé la respiration de ces cellules après une demi-heure, une, deux et trois heures à 37°C. Après une demi-heure à cette température, les cellules montrent une consommation d'oxygène plus faible qui devient nulle au bout d'une heure. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler à 30°C, température à laquelle les cellules survivent plus longtemps.

Nous avons donc choisi comme méthode la digestion à la collagénase qui fournit des cellules semblant en bon état. Cependant d'autres enzymes ont été testées pour leur action dispersante sur les tissus. L'hyaluronidase ne semble pas active sur le matériel intercellulaire ni des tissus embryonnaires, ni des tissus adultes. L'efficacité de l'élastase décrite par RINALDINI(387) est encore à prouver. Ces différentes enzymes ont pu aussi être utilisées en association lors de l'isolement de cellules hépatiques (394, 395) ou de cartilage (396).

Enfin, on a aussi utilisé des techniques de dissociations chimiques par suppression de cations divalents.

En effet, le calcium est indispensable au maintien des contacts cellulaires normaux (386, 387). Une diminution modérée des cations divalents des tissus d'oiseaux ou de mammifères (par exemple, par des bains de solutions salines dépourvues d'ions calcium et magnésium) n'entraîne pas en général une dissociation complète des cellules. Il se produit cependant un "relâchement" des liens et un tel traitement potentialise l'effet d'enzymes protéolytiques. L'EDTA, le citrate ou un pH alcalin peuvent augmenter l'action de solutions sans calcium ni magnésium. Ces substances peuvent être utilisées pour de jeunes embryons, mais pour des tissus adultes, elles sont peu efficaces et rarement employées. Une exception importante cependant est la technique préconisée par ANDERSON (385) pour obtenir des suspensions de cellules hépatiques. La viabilité de cellules ainsi préparées n'est pas connue.

Connaissant les problèmes posés par l'action des ions sur la solubilisation des enzymes, nous avons évité d'utiliser ces techniques.

Avec les cellules préparées par "peignage" puis digestion à la collagénase, nous avons effectué des études de libération d'enzymes sous l'influence de différents facteurs. Cette étude a été menée d'abord par une technique en flux continu puis par des méthodes par prélèvements successifs.

7.3. ETUDE DE LA LIBERATION DES ENZYMES

7.3.1. MESURES EN FLUX CONTINU

Nous avons fait appel à une technique en flux continu de mesures simultanées de l'activité enzymatique de l'aldolase selon la méthode de KALDOR et SCHIAVONE (397) et des protéines par la méthode de LOWRY (332). L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une solution de dihydroxyacétone pour l'aldolase et d'albumine bovine pour les protéines. Après isolement et contrôle de viabilité, les cellules sont placées dans un dispositif thermostaté en verre, spécialement conçu à cet effet. (figure 15).

Ce dispositif a une contenance de 2 ml. Il est relié à une pompe permettant l'introduction continue de milieu frais. Le conduit de sortie dirige le milieu baignant les cellules à travers un filtre vers un appareil d'analyse. Un bouchon rodé percé d'un fin capillaire permet l'introduction brusque d'un réactif, substrat... Le contenu de la cellule est agité à l'aide d'un barreau aimanté. Le circuit est conçu de telle façon que la quantité de milieu frais arrivant soit exactement égale à la quantité de milieu allant vers l'appareil d'analyse.

Il nous a fallu tout d'abord fixer les conditions opératoires : 100 mg de cellules sont placés dans le dispositif thermostaté à 30°C contenant 1,7 ml de différents milieux (chlorure de sodium 0,9 %, solution de Krebs-Ringer bicarbonatée). Les conditions d'agitation ont aussi été examinées.

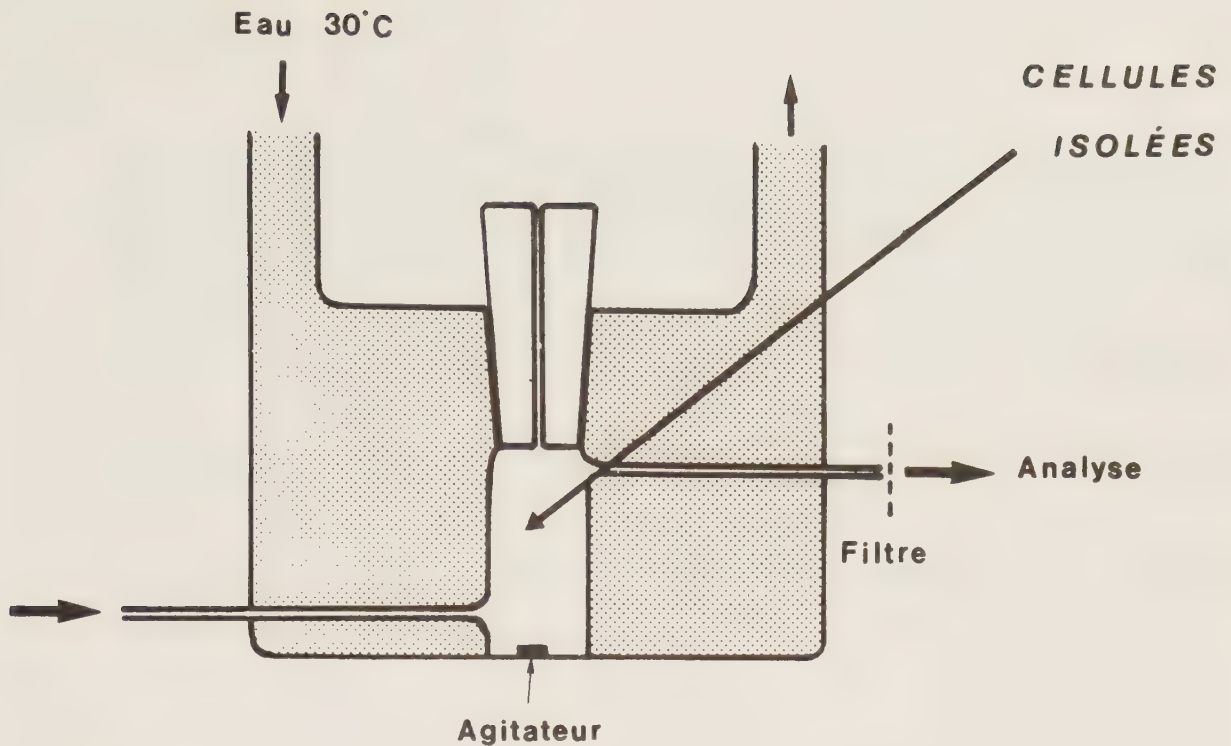


Figure 15 : Dispositif thermostaté utilisé

Le graphique 16 montre un exemple d'enregistrement en continu de l'activité de l'ALD et des protéines totales de 100 mg de cellules à 30°C à deux vitesses d'agitation.

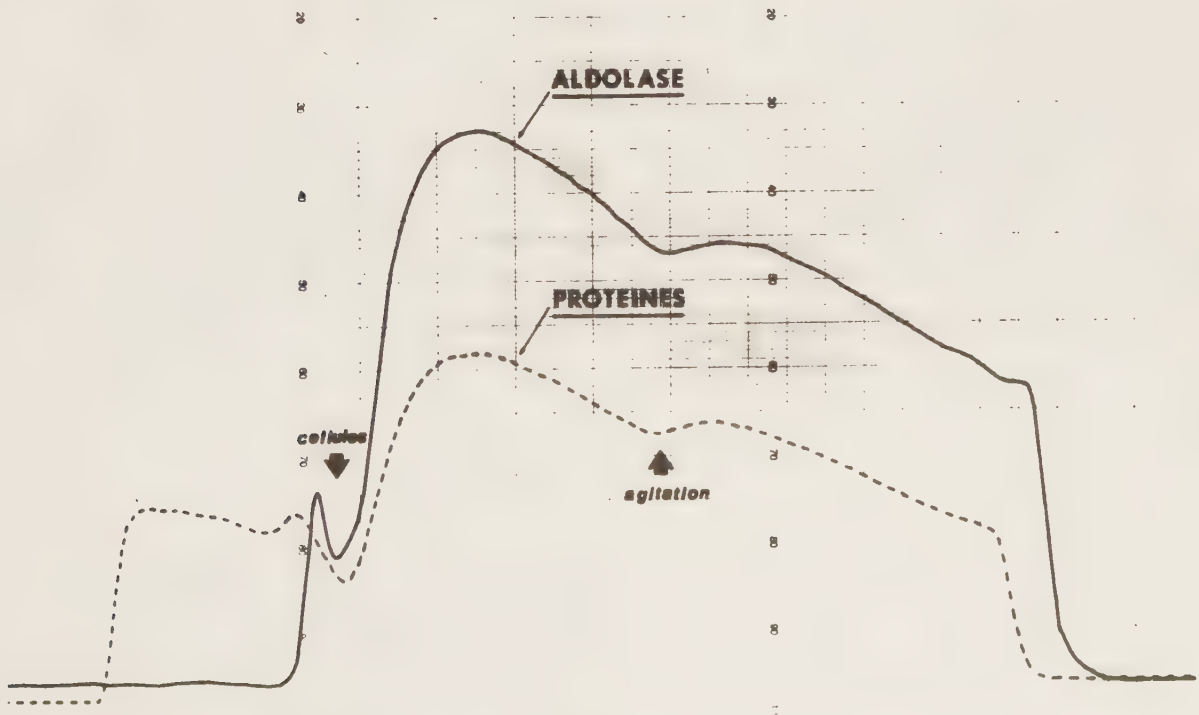


Figure 16 : Sorties d'enzymes de cellules musculaires isolées. Influence de la vitesse d'agitation (enregistrement des profils obtenus pour ALD (—) et protéines (- -)).

On observe une montée rapide dès l'addition des cellules. Les activités atteignent un plateau pour redescendre ensuite. Lorsque la vitesse d'agitation est brusquement augmentée, il se produit de "légers décrochements" sur les courbes indiquant une sortie accrue d'aldolase et de protéines. Cependant la diminution des activités semblait anormale. Nous avons calculé que le contenu de la cuve thermostatée était renouvelé toutes les cinq minutes ce qui explique la courbe descendante. En effet, aldolase et protéines, au lieu de s'accumuler en fonction du temps, sont éliminés très rapidement.

Nous avons alors utilisé un dispositif semblable mais dont le volume intérieur est de 100 ml. Il nous a fallu définir les nouvelles conditions opératoires.

Le graphique 17 montre un exemple d'enregistrement de l'aldolase et des protéines avec ce nouveau dispositif.

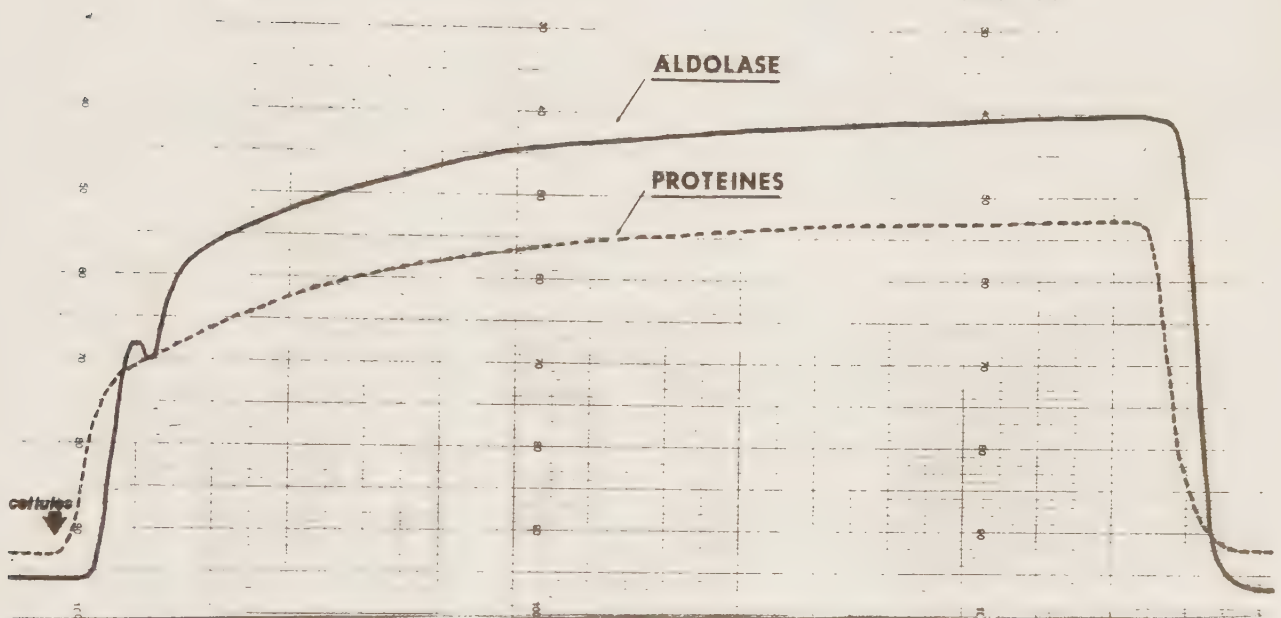


Figure 17 : Sortie d'enzymes des cellules musculaires isolées.
Expérimentation témoin
Enregistrement des profils obtenus pour ALD (—)
et protéines (- -)

Dès l'addition de cellules, l'activité de l'ALD et le taux de protéines du milieu extracellulaire augmentent. Cet accroissement se poursuit en fonction du temps.

Cependant un problème très difficile à résoudre est celui de la quantification des résultats. En effet, il faut tenir compte des volumes de liquide arrivant dans le dispositif et ceux en sortant chargés d'enzymes et de protéines. De plus, si on veut tester l'action d'une substance, la concentration appropriée sera effective au début de l'expérimentation mais les liquides sortant emportent une partie de cette substance et il faudra tenir compte de la décroissance de sa concentration en fonction du temps. Des équations complexes sont nécessaires pour calculer les phénomènes cinétiques et nous avons préféré utiliser dans un premier temps, une méthode par prélèvements successifs.

7.3.2. MESURES PAR PRELEVEMENTS DISCONTINUS

Ces essais ont été effectués à l'aide du dispositif précédemment décrit dont les capillaires sont obturés. Des échantillons de 1 ml sont prélevés périodiquement.

Nous avons effectué deux séries d'essais, l'une en faisant des expérimentations successives, témoin et essais dans un seul dispositif, l'autre en faisant des expérimentations parallèles, dans deux dispositifs thermostatés.

7.3.2.1. Essais successifs

Des prélèvements ont été effectués toutes les cinq minutes pendant la première heure et toutes les quinze minutes au cours de la seconde heure. Les activités enzymatiques de l'ALD, la CPK, la LDH, la MDH et de la GOT ont été mesurées par les méthodes précédemment décrites (chapitre III). Les protéines totales ont été mesurées par la méthode de LOWRY (332).

A la fin de chaque expérimentation, les cellules sont récupérées, centrifugées, pesées et broyées dans quatre fois leur volume (v/w) de solution d'extraction.

Nous avons mesuré les activités enzymatiques de chacun des échantillons et celles du broyat de cellules. Nous avons rapporté ces valeurs à 1 g de muscle frais puis nous avons calculé nos résultats en pourcentages. La somme des activités enzymatiques mesurées dans le broyat et dans l'échantillon prélevé au bout de deux heures d'incubation représente le 100 % d'activité.

En premier lieu, nous avons mesuré la sortie des enzymes des cellules dans différents milieux :

- . Saccharose 0,25 mol
- ou . Chlorure de sodium..... 0,154 mol
- . Milieu de Krebs-Ringer bicarbonaté pH 7,4 (338)

La figure 18 montre la sortie des différentes enzymes des cellules en incubation à 30°C dans du saccharose 0,25 mol.

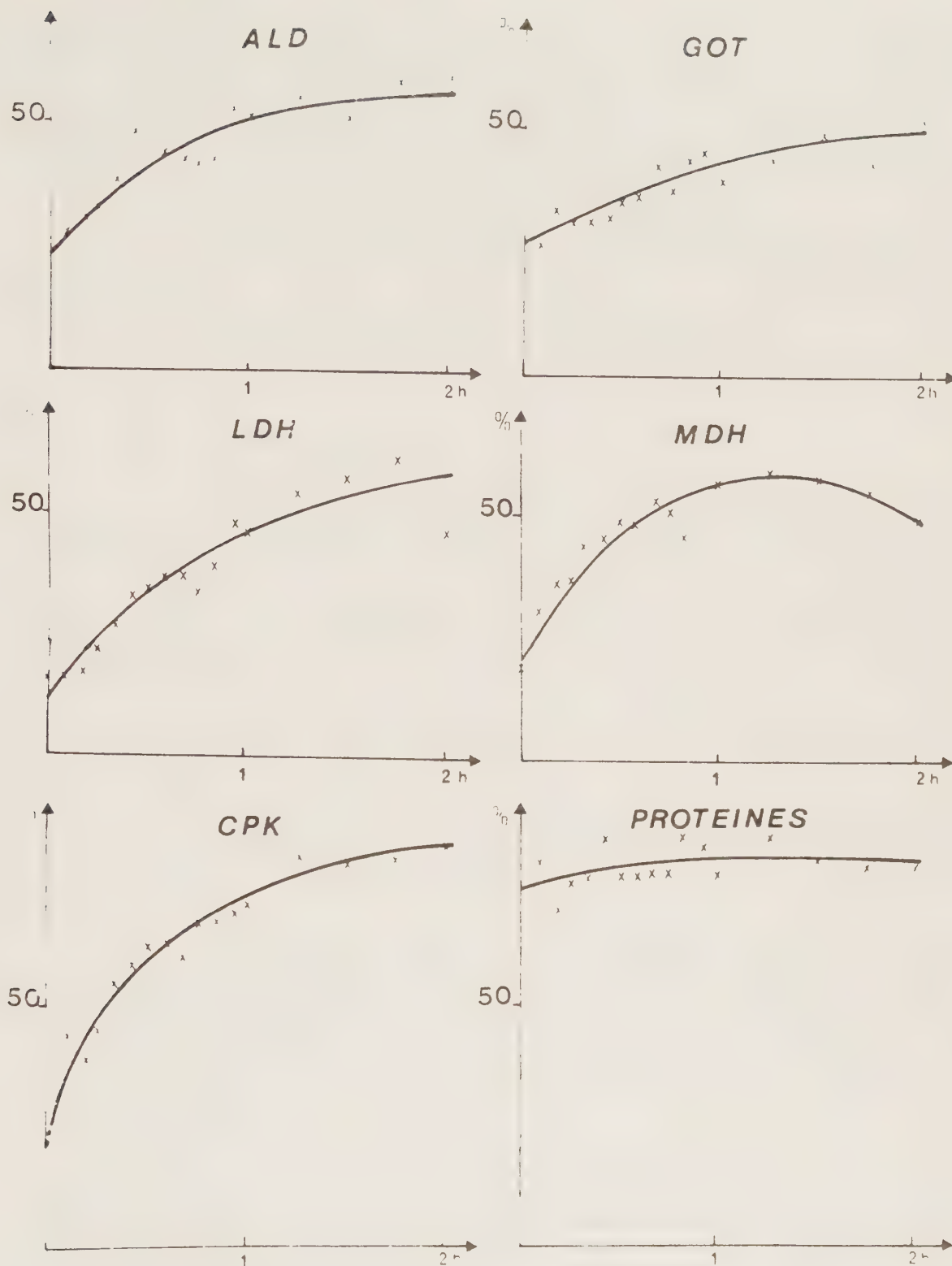


Figure 18 : Sortie d'enzymes des cellules musculaires maintenues en survie
Essai témoin. Milieu saccharose 0,25 mol.

Chaque graphique est la moyenne de cinq essais. Les enzymes sont libérées en grandes quantités dès le début de l'incubation et au bout de deux heures, la sortie est de l'ordre de 50 %. Pour les protéines et la CPK, la sortie atteint 80 %. Ceci est évidemment un écueil à une étude de libération sous l'influence de substances externes. Si les cellules-témoins libèrent 50 à 80 % de leurs enzymes intracellulaires, elles sont vraisemblablement en mauvais état. L'addition de lactate à deux concentrations : 5 et 30 mmol/l à pH 5 ou 7 n'a entraîné aucune libération supplémentaire.

De plus, la reproductibilité et la dispersion sont telles que les résultats sont difficilement interprétables, une petite variation étant peu significative.

C'est pourquoi nous avons effectué une seconde série d'expérimentations en utilisant deux dispositifs thermostatés.

7.3.2.2. Essais parallèles

Les cellules sont isolées, lavées et centrifugées. Des quantités identiques sont placées dans les deux dispositifs. L'un des flacons thermostatés est utilisé comme témoin, l'autre contient la substance à tester.

Nous avons ajouté du lactate à 100 mmol/l à pH 5 ou pH 7. Des prélèvements sont effectués tous les quarts d'heure pendant la première heure puis toutes les demi-heures pendant les deux heures suivantes. Seules ALD et CPK ont été dosées.

Le schéma 19 montre les résultats obtenus pour ALD et CPK aux deux pH testés. Chaque résultat est la moyenne de trois essais, comme précédemment, ils sont exprimés en pourcentages.

Les différences entre essais et témoins sont faibles. On note cependant à pH 7,0 une augmentation de la sortie des enzymes surtout de l'ALD. La CPK est libérée en quantité supérieure à l'essai-témoin au cours de la première heure.

La libération d'enzymes par les cellules témoins est considérable (elle varie entre 40 à 70 %) après trois heures d'incubation. Nous avons constaté que le contenu en enzymes des cellules isolées est très inférieur à celui trouvé dans un muscle non traité. Les broyats des cellules traitées ont une activité enzymatique qui n'atteint que les deux tiers de l'activité trouvée dans un muscle. Le "peignage", le traitement à la collagénase entraînent donc une perte importante.

La reproductibilité des essais est médiocre. Il est très difficile de placer dans les dispositifs thermostatés des quantités équivalentes de cellules isolées. Nous avons opéré par pesée mais nous ne possédons aucun moyen de vérifier que les deux masses contiennent le même nombre de cellules viables et en bon état. Seul le dosage des protéines peut donner une information à posteriori.

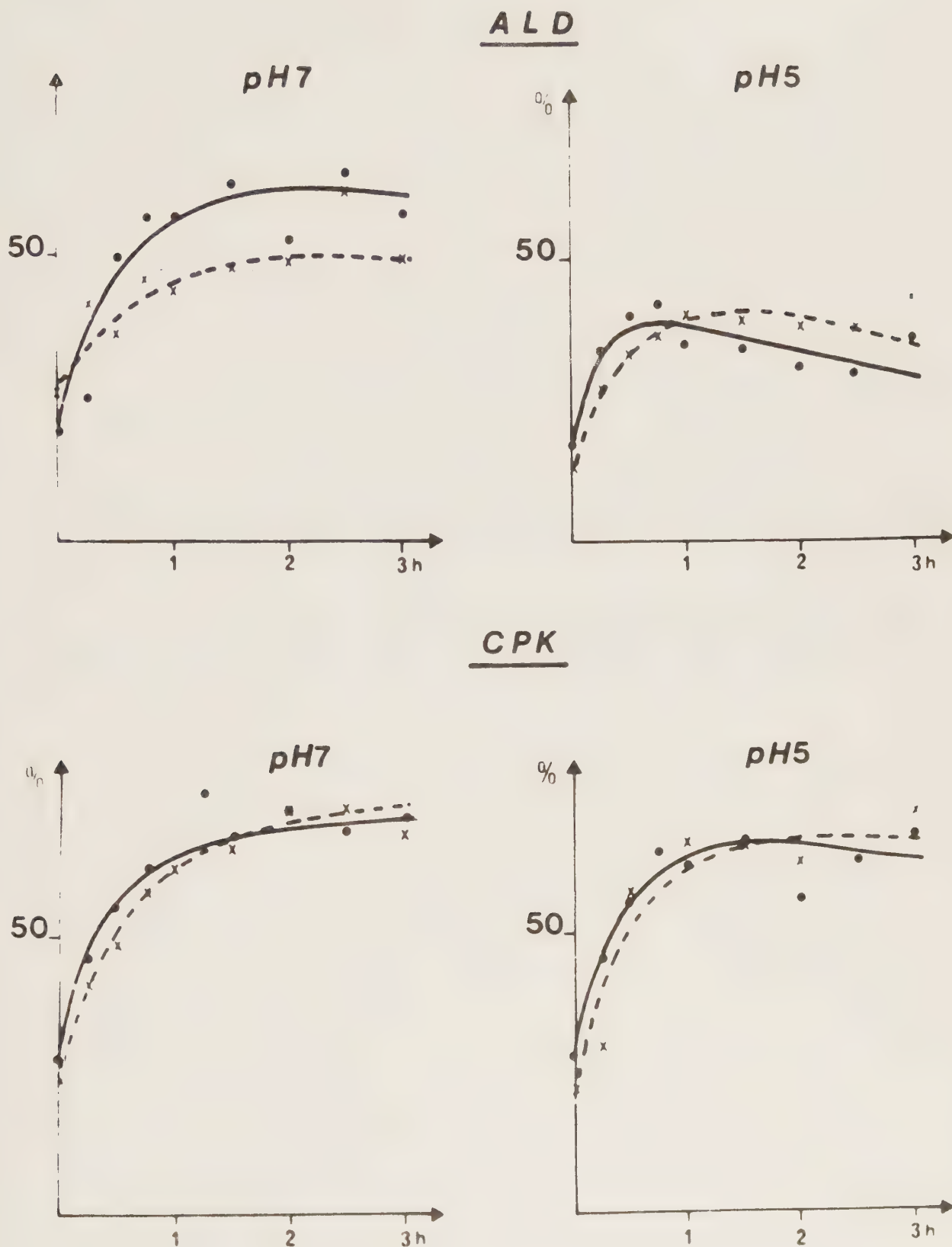


Figure 19 : Sortie d'enzymes des cellules musculaires isolées.
Influence du lactate 100 mmol à pH 7,0 et 5,0.
(*- -*) témoin (•—•) essai

Devant ces difficultés d'utilisation de cellules musculaires isolées, nous avons commencé des essais sur des muscles entiers isolés n'ayant subi aucun traitement.

Les essais sur cellules sont poursuivis en essayant de mettre au point des milieux nutritifs plus adaptés. Ils permettront aux cellules isolées, perturbées par tous les traitements subis, de "récupérer" au moins en partie, une activité métabolique suffisante pour maintenir l'intégrité membranaire.

Cependant, les résultats obtenus indiquent que la technique que nous avons mise au point, après perfectionnement, pourra donner des informations intéressantes.

+ + +

SORTIE D'ENZYMES DU MUSCLE SQUELETTIQUE ENTIER ISOLE



Les traitements subis par les cellules musculaires lors de leur dissociation risquant de rendre difficile l'interprétation des résultats de sortie d'enzymes, nous avons simultanément mis en route des expérimentations avec des muscles entiers isolés et maintenus en survie. Le muscle, subissant au cours de son prélèvement le moins de traumatismes possible, voit son métabolisme peu altéré.

Nous avons recherché l'action des substrats spécifiques des enzymes dont nous mesurons l'activité fructose 1-6 diphosphate et créatine phosphate puis celle du lactate de sodium, métabolite libéré en quantité considérable au cours de l'effort.

Enfin, afin d'amplifier les phénomènes, nous avons utilisé des détergents comme le Triton X 100 ou des médicaments comme les biguanides hypoglycémiants et les neuroleptiques.

8.1. MATERIEL ET METHODES

8.1.1. PRELEVEMENT

Des rats mâles de souche Sprague Dawley de 200 à 250 g sont tués par décapitation après un jeûne de 8 heures environ. Les muscles gastrocnémiens sont prélevés immédiatement et en entier. Pour ce faire, au bas de la patte, le tendon est dénudé puis coupé le plus près possible de l'os et à sa partie supérieure, l'insertion étant plus diffuse, la rotule est prélevée afin que le muscle ne subisse aucun traumatisme. Les muscles sont rincés par deux fois à l'aide de solution de Krebs-Ringer bicarbonatée, pH 7,4, refroidie à 4°C, séchés rapidement sur papier filtre puis pesés.

8.1.2. INCUBATION

Les deux muscles sont placés dans les deux dispositifs thermostatés précédemment décrits et contenant 90 ml de solution de Krebs-Ringer bicarbonatée pH 7,4 amenés à la température de 30°C. La substance à tester est immédiatement ajoutée dans l'un des flacons. L'autre dispositif servant de témoin.

Après cette addition, les premiers prélèvements de 1 ml sont effectués dans les deux dispositifs. Ensuite, des échantillons du même volume (1 ml) sont prélevés après un quart, une demie, une, deux et trois heures d'incubation. Pendant l'incubation, les flacons thermostatés sont animés d'un mouvement rotatif lent horizontal grâce à un agitateur New-Brunswick.

A la fin des trois heures d'incubation, les muscles sont récupérés, séchés rapidement, pesés puis broyés.

8.1.3. BROYAGE

Les muscles sont débarrassés de la rotule, pesés à nouveau puis broyés dans quatre fois leur volume de solution de Krebs-Ringer bicarbonatée, pH 7,4 à l'aide d'un broyeur Ultra Turrax pendant six fois dix secondes à 4°C. Chaque période de broyage est séparée de la suivante par dix secondes afin de réduire au maximum les risques d'échauffement. Les broyats sont centrifugés à 5000 g en centrifugeuse réfrigérée Janetzki K 24 pendant vingt minutes. Les surnageants sont prélevés et conservés à 4°C jusqu'au moment des dosages.

8.1.4. METHODES ANALYTIQUES

Les activités de l'ALD et de la CPK sont mesurées selon les méthodes précédemment décrites (chapitre III). Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY et coll. (332). Les mêmes analyses sont faites sur les broyats musculaires dilués dans du chlorure de sodium à 0,9 %.

Nous nous sommes assurés dans tous les cas que les substances ajoutées au milieu n'interféraient pas dans les dosages. Cette vérification a été effectuée par surcharge du liquide baignant le muscle-témoin après que celui-ci ait été enlevé et traité séparément.

8.1.5. CALCULS

Pour chaque expérimentation, nous avons calculé les activités enzymatiques et les taux de protéines en tenant compte de la diminution de volume occasionnée par les prélèvements successifs et du poids du muscle.

Nous avons ensuite calculé les pourcentages d'enzymes et de protéines libérées. Nous avons utilisé comme valeur 100 %, la somme des activités du dernier prélèvement (trois heures d'incubation) et du broyat musculaire de l'essai proprement dit.

8.1.6. VERIFICATION DE LA MORPHOLOGIE ET CONTROLE DE LA SURVIE

8.1.6.1. Microscopie électronique

Après fixation au glutaraldéhyde puis à l'oxyde d'osmium, les fragments musculaires sont inclus dans de l'Epon 18 puis les coupes-coloration sont effectuées (363).

L'observation des photos obtenues montre une image tout à fait classique pour le muscle qui vient d'être prélevé. Lorsque le muscle a été

incubé trois heures dans du milieu de Krebs-Ringer bicarbonaté, il se produit un gonflement du sarcoplasme qui augmente l'intervalle entre les fibres musculaires. De plus, les mitochondries sont gonflées.



Figure 20 : Muscle venant d'être prélevé (X 8 000)

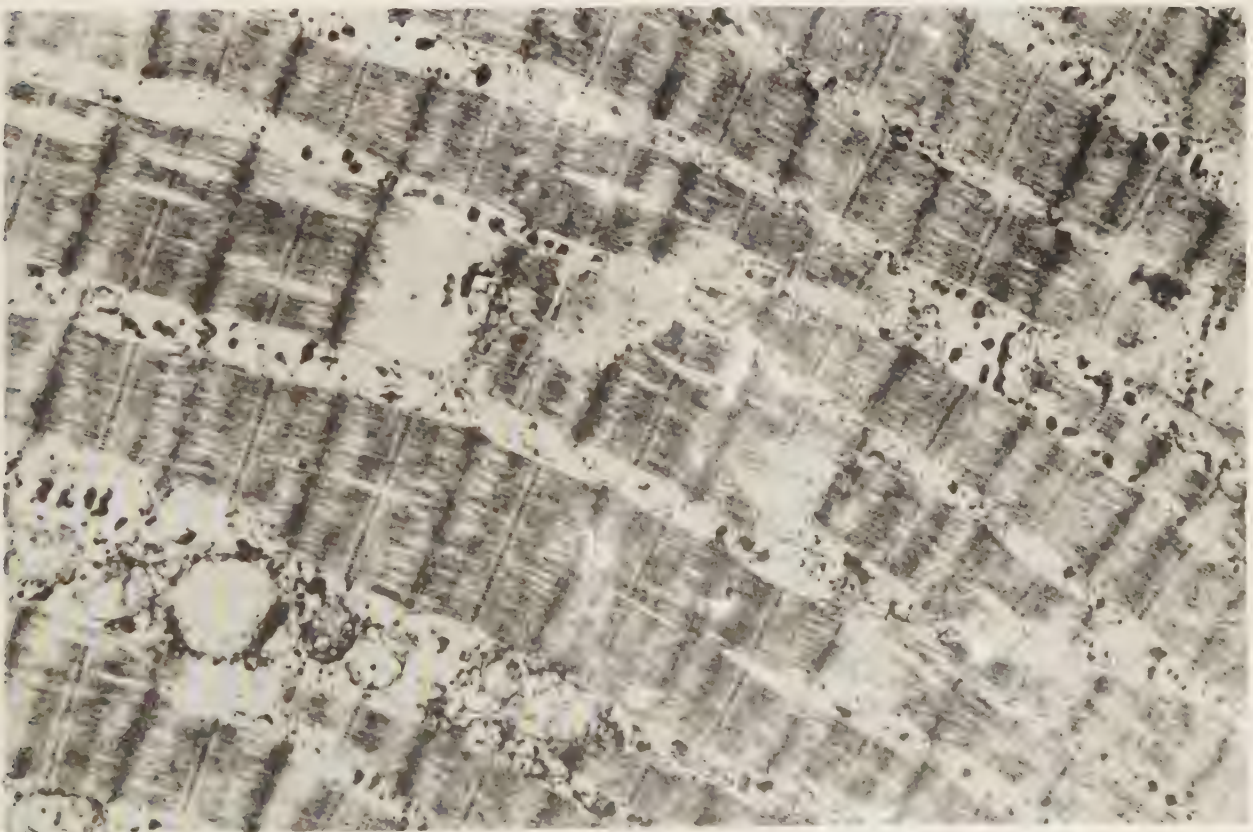


Figure 21 : Muscle incubé 3 heures dans du milieu Krebs-Ringer bicarbonaté (X 8 000)

8.1.6.2. Dosages du sodium et du potassium

Après trois heures d'incubation, les taux de potassium des milieux baignant les muscles sont très légèrement augmentés. Cette augmentation est supérieure pour le muscle traité (+ 0,70 mEq/l) par rapport au muscle témoin (+ 0,34 mEq/l). Le niveau du potassium musculaire est abaissé dans les mêmes proportions. A l'inverse, il se produit un faible accroissement du sodium intracellulaire avec baisse du sodium du milieu.

Cette vérification permet donc de dire qu'au bout de trois heures, le muscle a subi une très légère altération membranaire.

8.2. RESULTATS ET DISCUSSION

8.2.1. SORTIE D'ENZYMES DES MUSCLES-TEMOINS

Nous avons tracé sur le graphique 22, les courbes de libération en fonction du temps, de la CPK, de l'ALD et des protéines de muscles-témoins baignant dans du milieu de Krebs-Ringer bicarbonaté, pH 7,4 à 30°C.

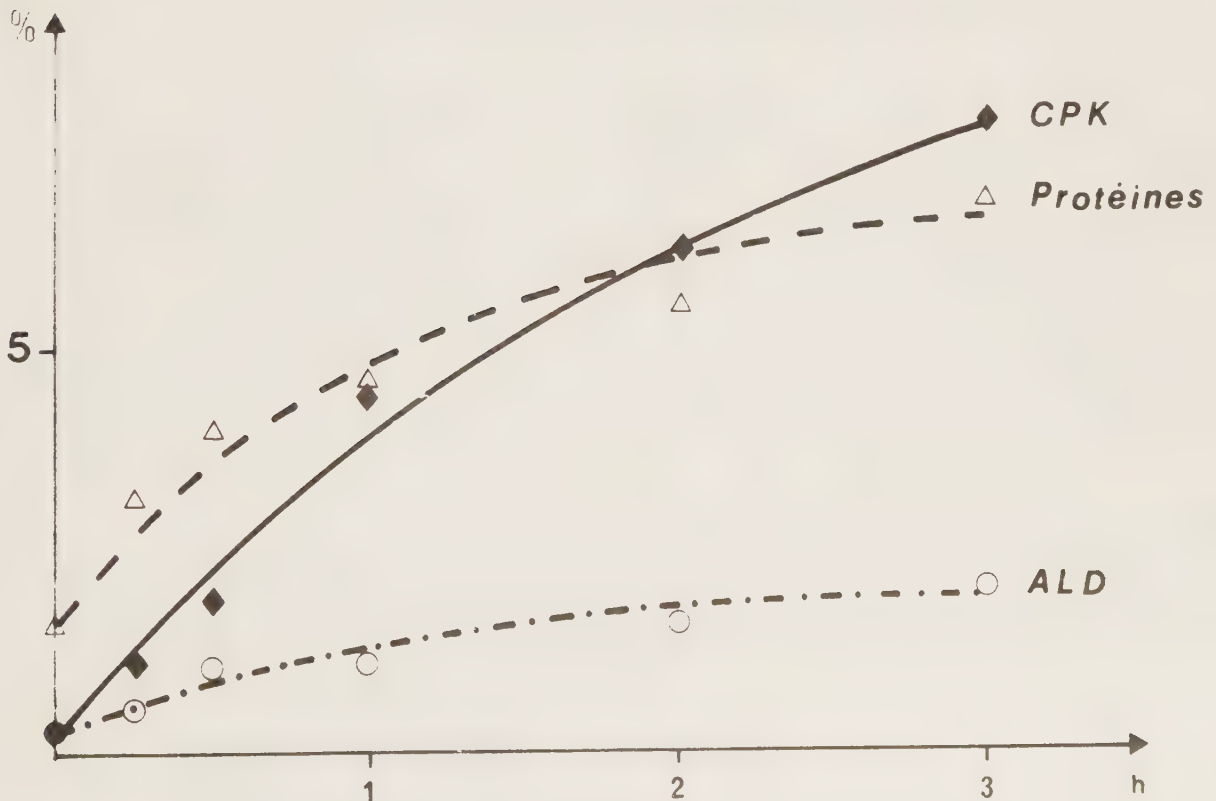


Figure 22 : Sortie d'ALD, CPK et protéines en fonction du temps.
Essais-témoins.

Il faut tout d'abord remarquer que si ALD et CPK ont des activités très faibles dans le premier prélèvement, le niveau des protéines est déjà à environ 1,5 %. Il se produit donc une libération de protéines au cours des manipulations préliminaires (prélèvement, séchage, pesée).

Il est évident aussi que l'ALD sort en moins grande quantité que la CPK ou les protéines. Ces résultats sont en accord avec ceux de DAWSON (233). En effet, les pourcentages de libération obtenus par cet auteur au bout d'une heure d'incubation montrent que la CPK sort environ trois fois plus vite que l'ALD.

Enfin, la sortie est rapide pendant les trente premières minutes puis la vitesse diminue progressivement. D'autres auteurs ont observé le même phénomène pour certaines enzymes musculaires (233) ou hépatiques (167, 398).

Donc un muscle entier placé dans un milieu non nutritif à 30°C laisse sortir des enzymes et des protéines dans le milieu extérieur.

Ce niveau de base servira de point de comparaison dans nos expérimentations suivantes et permettra de définir la capacité de diverses substances à libérer des enzymes intracellulaires.

Les premiers composés qui nous ont paru intéressants sont les substrats spécifiques des enzymes qui sont capables d'influencer leur solubilité.

En effet, les enzymes, même si elles sont dites "solubles", ne sont pas libres dans le cytoplasme mais se trouvent liées plus ou moins fortement à l'intérieur de la cellule. Ainsi, une grande partie de l'aldolase extractible de l'encéphale ou du muscle de rat est accrochée à la fraction particulaire de ces organes (273). Les substrats ou certains métabolites sont capables de se lier à l'enzyme et de diminuer ses liaisons avec les protéines intracellulaires. Ceci a été mis en évidence, en particulier, par les travaux de CLARKE et coll. (273, 361) et d'ARNOLD et coll. (365) et grâce aux méthodes d'extraction que nous avons examinées plus en détail dans le chapitre VI. Il se produirait donc un réarrangement moléculaire et l'enzyme ayant moins d'affinité pour les protéines serait libérée et pourrait passer dans le milieu cytoplasmique puis dans le milieu extracellulaire.

C'est cette hypothèse que nous avons voulu tester en utilisant d'une part les substrats spécifiques des enzymes que nous étudions : fructose 1-6 diphosphate et créatine phosphate, d'autre part l'acide lactique métabolite, qui, d'après CLARKE et coll. (273) diminue la liaison aldolase-protéines musculaires in vitro.

8.2.2. INFLUENCE DES SUBSTRATS ET METABOLITES

8.2.2.1. Fructose 1-6 diphosphate

Des quantités de ce substrat sous forme de sel trisodique ont été ajoutées de façon à obtenir des concentrations finales de 0,01 - 0,1 - 1 et 10 mmol. Les graphiques 23, 24 et 25 montrent les résultats obtenus.

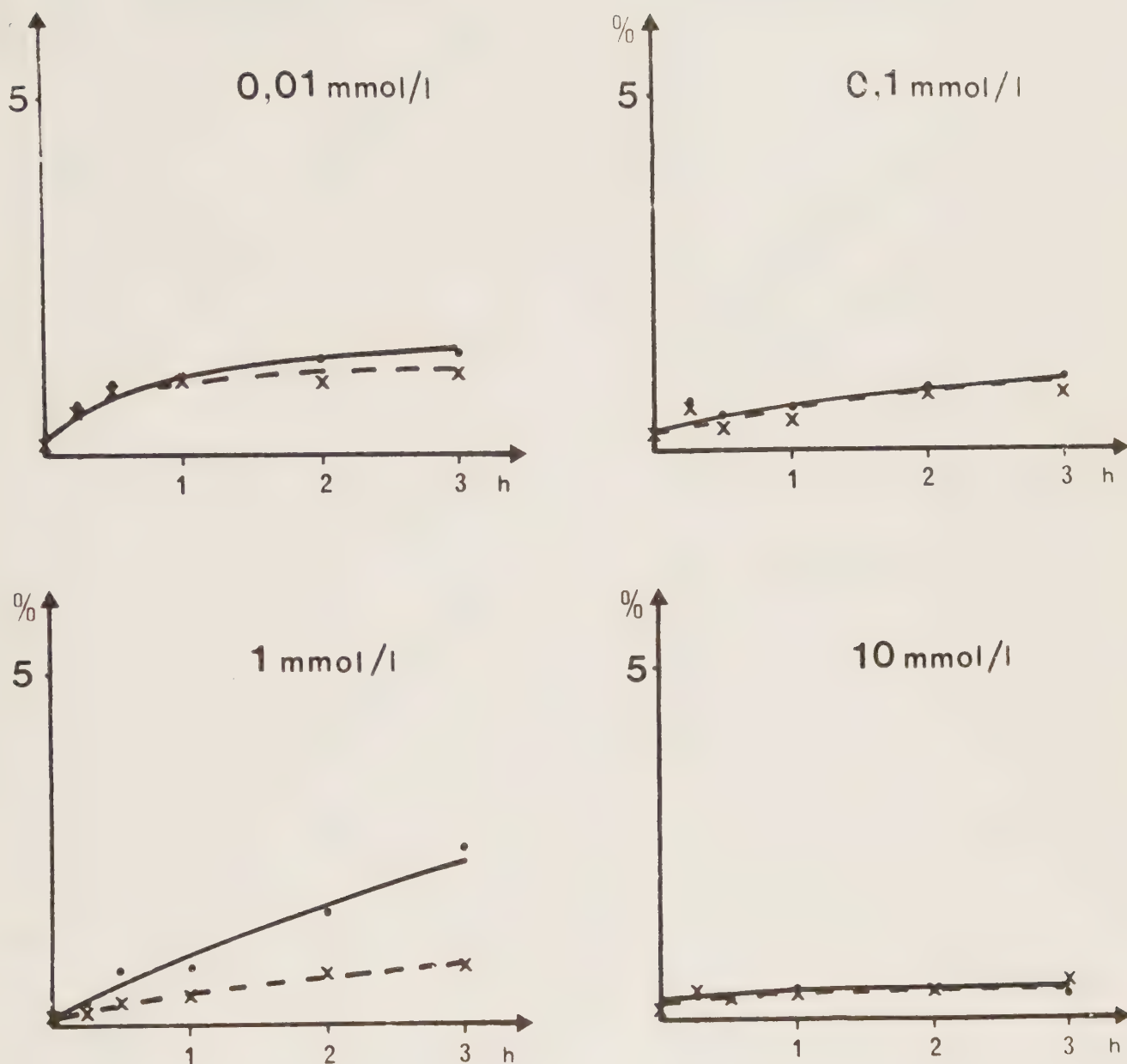


Figure 23 : Sortie d'ALD du muscle entier de rat. Influence de différentes concentrations de fructose 1-6 diphosphate
(x--x) témoin (●—●) essai

En ce qui concerne l'ALD, seule la concentration 1 mmol/l entraîne une légère sortie d'enzymes. Pour les autres concentrations, il n'y a pas plus d'ALD dans le milieu baignant le muscle que dans l'essai-témoin.

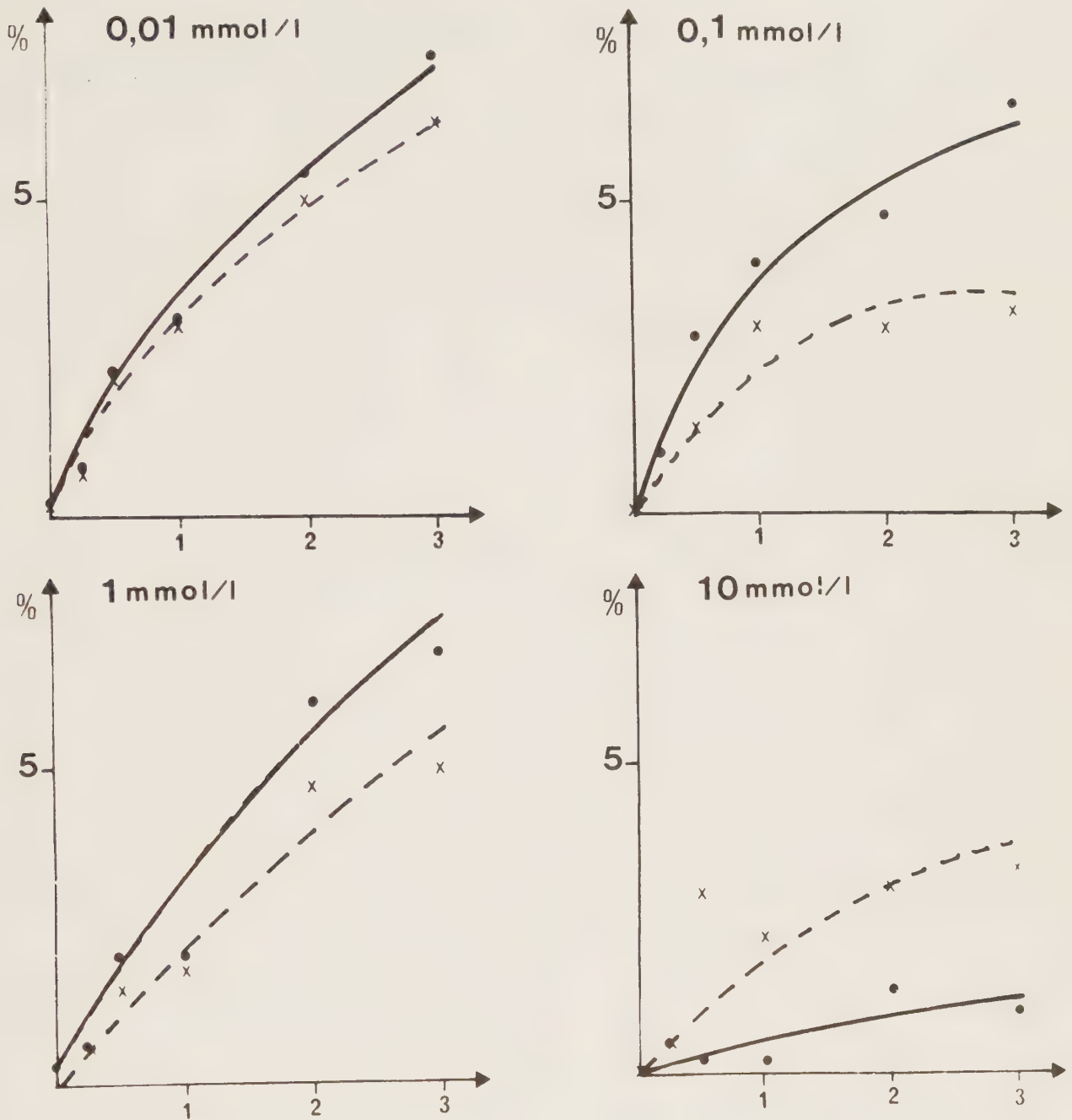


Figure 24 : Sortie de CPK du muscle entier de rat. Influence de différentes concentrations de fructose 1-6 diphosphate.
(x--x) témoin (●—●) essai

La CPK quant à elle, est libérée aux plus faibles concentrations mais à la concentration de 10 mmol/l il semble se produire une stabilisation et la sortie est moins importante que dans l'essai témoin. Ce phénomène semble apparaître aussi avec l'ALD mais les variations sont trop faibles pour être interprétées.

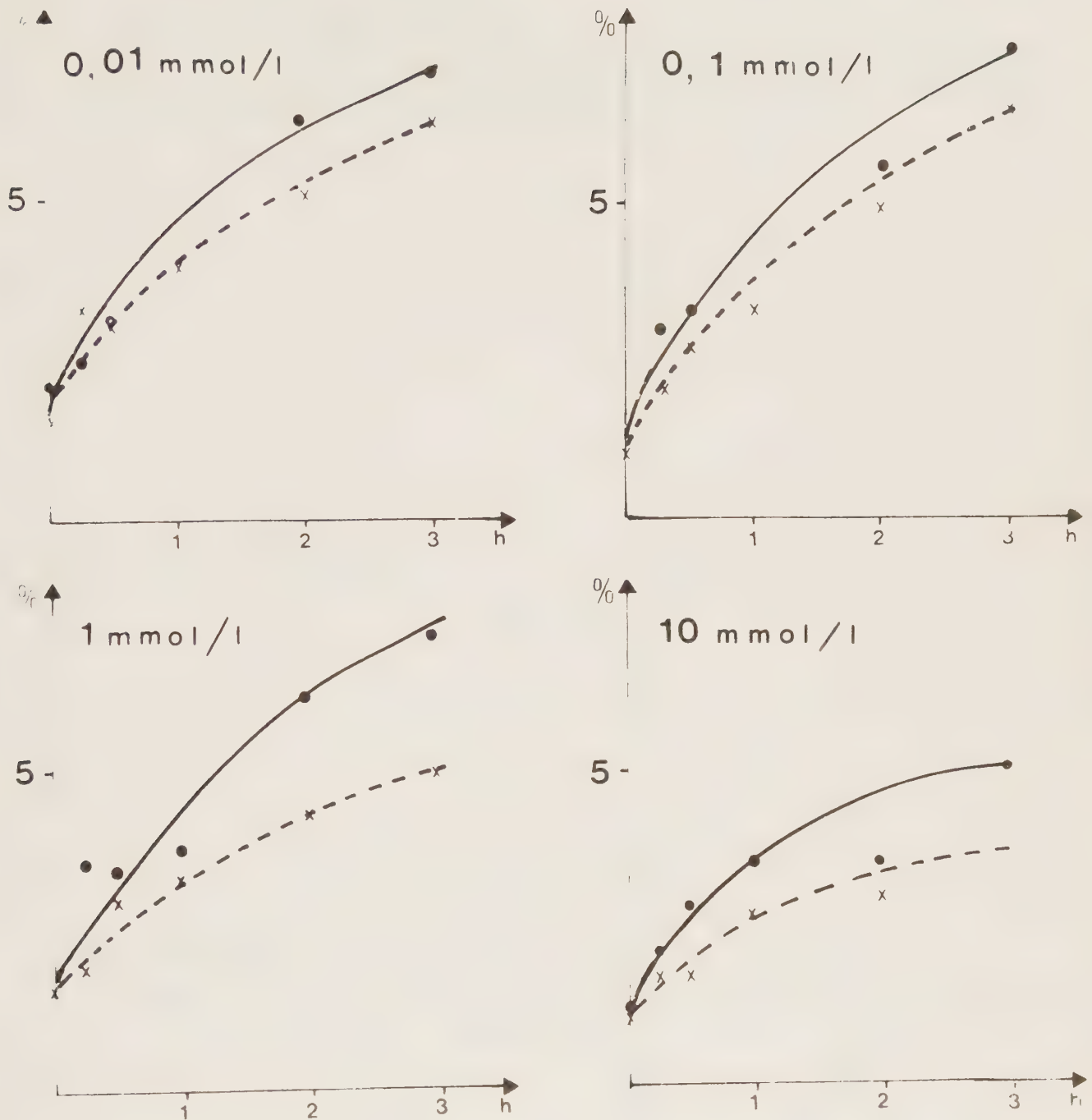


Figure 25 : Libération des protéines du muscle entier de rat. Influence de différentes concentrations de fructose 1-6 diphosphate.
(x-x) témoin (•-•) essai

Les protéines sont libérées avec toutes les concentrations employées, la sortie la plus importante quantitativement se produit avec 1 mmol/l.

Ces résultats corroborent parfaitement ceux de CLARKE et coll. (361) du moins en ce qui concerne l'ALD. Ces auteurs ont en effet montré que le fructose 1-6 diphosphate est capable de libérer complètement l'ALD de la F-actine. Mais ces auteurs utilisaient des solutions de protéines purifiées.

8.2.2.2. Créatine-phosphate

Ce substrat a été utilisé à l'état de sel de sodium aux concentrations de 1, 10 et 100 mmol/l.

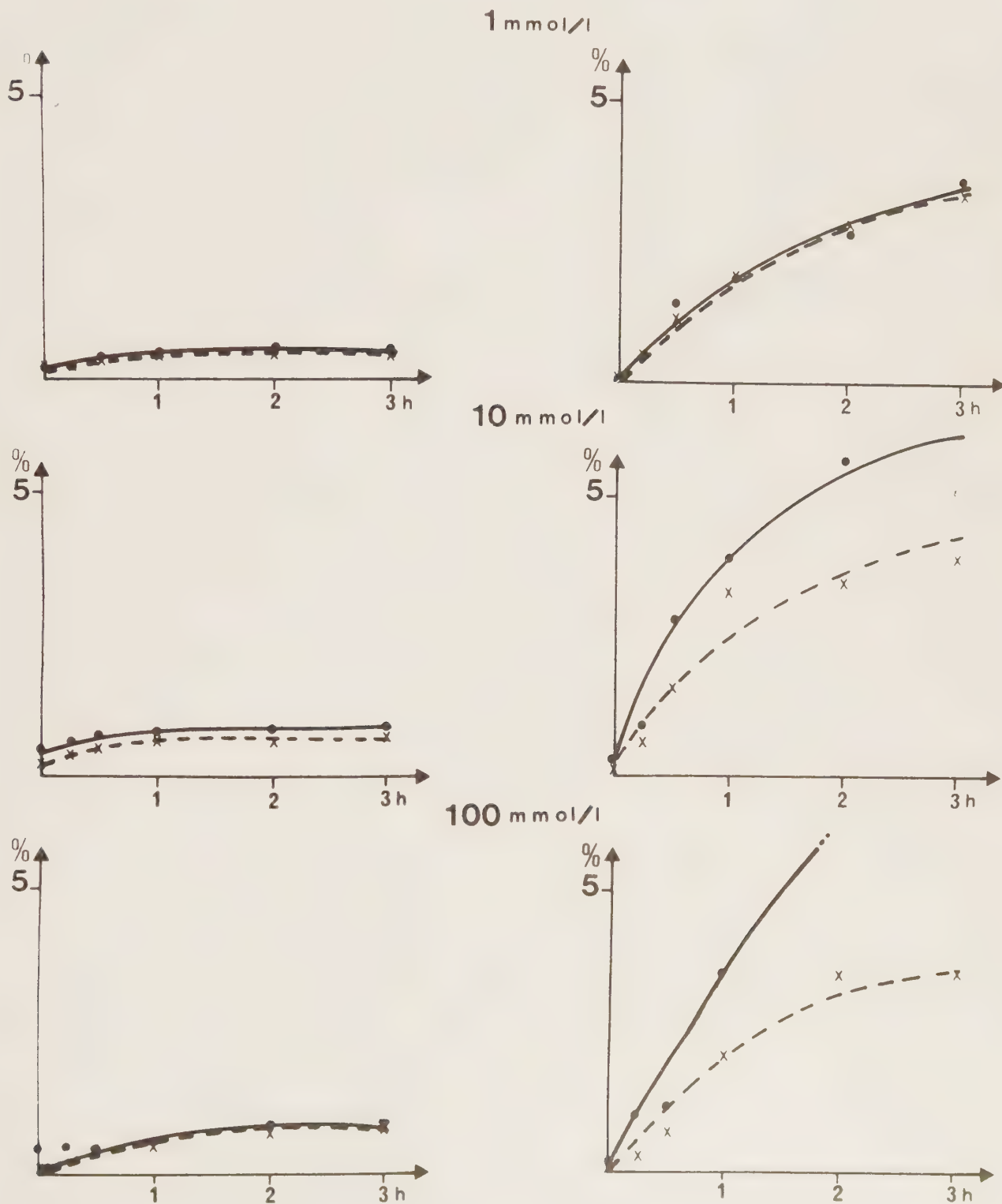


Figure 26 : Libération d'ALD et de CPK du muscle entier sous l'influence de différentes concentrations en créatine phosphate.
(x--x) témoin (●—●) essai

Le créatine phosphate, dans nos conditions opératoires, n'a aucune action sur la sortie d'ALD. Pour la CPK, il ne se produit aucune libération supplémentaire pour une concentration de 1 mmol/l. Par contre, les concentrations de 10 et 100 mmol/l produisent un accroissement considérable de l'activité de la CPK par rapport au témoin. Cette libération d'enzyme augmente en fonction de la concentration en substrat.

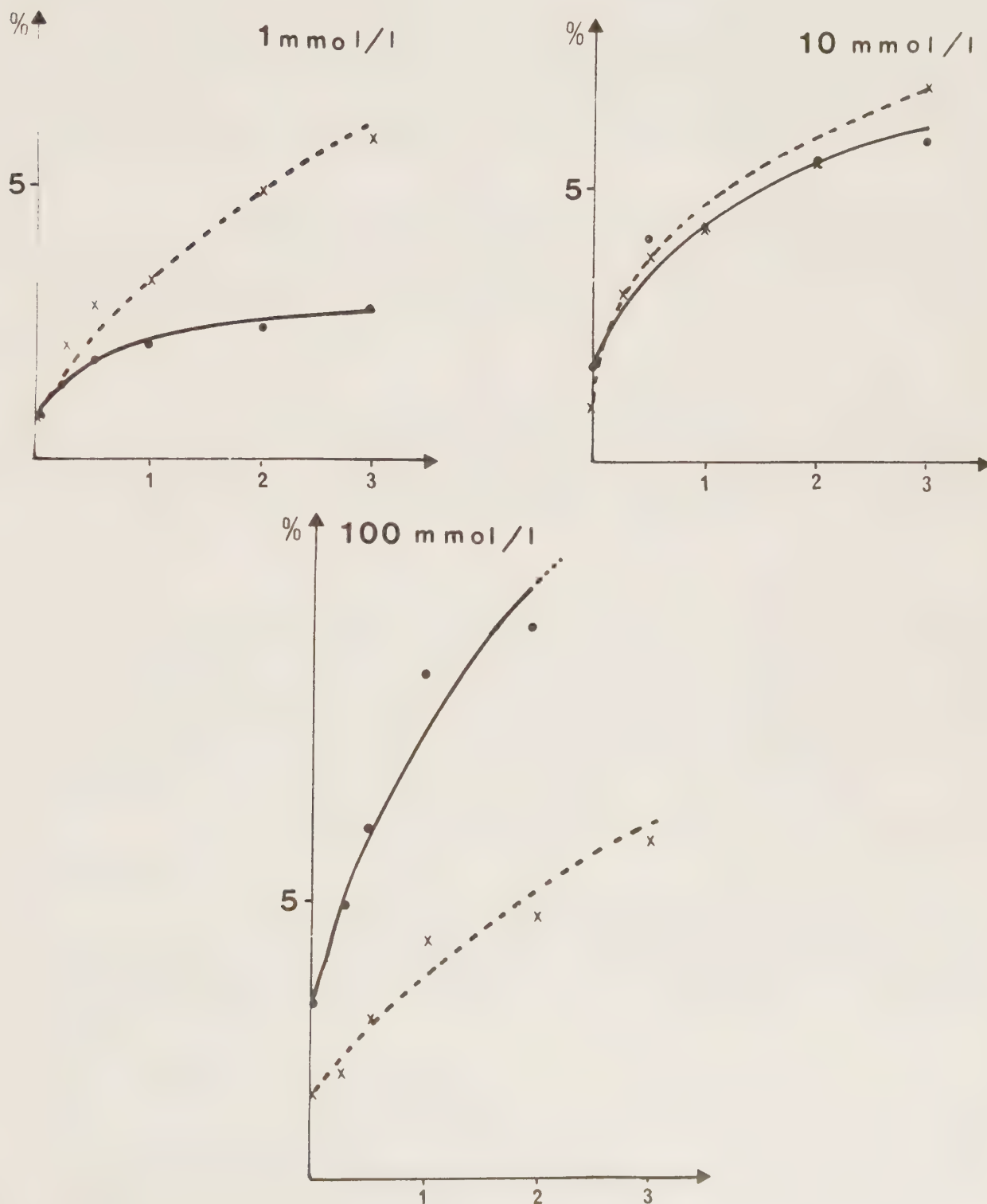


Figure 27 : Sortie des protéines du muscle entier sous l'influence de différentes concentrations en créatine phosphate.
(x-x) témoin (•-•) essai

Pour les protéines, on observe une stabilisation avec 1 mmol/l puis la concentration de 10 mmol/l n'a aucune action, enfin 100 mmol/l engendrent une sortie considérable.

Ces derniers résultats, obtenus avec les protéines, sont en accord avec d'autres observations. En effet, certaines substances (vitamines, médicaments) sont connues pour leur effet stabilisant à faible dose et lytique à dose élevée (241, 253, 261). De plus, on pouvait attendre une stabilisation de la membrane donc une inhibition de la sortie des enzymes grâce aux liaisons riches en énergie apportées par le créatine phosphate. En effet, l'ATP empêche la sortie des enzymes des mitochondries (249, 258), des lysosomes (255). Il semble que son action soit due à l'apport d'énergie puisque toute atteinte des mécanismes énergétiques augmente la libération des enzymes (144, 154, 249, 270, 399).

Cependant, il est étrange que cette stabilisation ne se produise pas pour les enzymes. Il est en effet étonnant de voir sortir moins de protéines mais autant de CPK ou d'ALD. L'effet important de sortie des protéines avec la concentration la plus élevée peut être également dû à la force ionique du composé ou de ses produits d'hydrolyse.

De l'action de ces deux substrats, on peut déduire que :

- l'ALD est peu influencée même par la présence de son substrat spécifique. Cependant celui-ci à la concentration de 1 mmol se révèle capable de faciliter le passage d'une faible quantité d'ALD dans le milieu extérieur (environ 1,5 % après 3 h d'incubation). Les liaisons riches en énergie apportées par le créatine phosphate n'ont aucune action sur la sortie de cette enzyme.

- la CPK est libérée beaucoup plus facilement. Le fructose 1-6 diphosphate aux plus faibles concentrations facilite la sortie d'une quantité importante de CPK. 10 mmol/l de ce substrat produisent une diminution de CPK dans le milieu baignant le muscle. Aucun effet net d'inhibition de la mesure de l'activité de cette enzyme n'a pu être mis en évidence. Il pourrait donc y avoir une stabilisation soit par action du fructose 1-6 diphosphate au niveau des membranes et inhibition du passage transmembranaire de l'enzyme, soit par action directe sur la liaison de l'enzyme à d'autres protéines

- le créatine phosphate, à partir de la concentration 10 mmol provoque une sortie importante d'enzymes.

- les protéines sont libérées dans les mêmes proportions en présence de fructose 1-6 diphosphate quelle que soit sa concentration. Par contre, le créatine phosphate diminue la sortie de protéines totales aux faibles concentrations pour l'augmenter d'une façon considérable aux concentrations plus élevées.

8.2.2.3. Lactate de sodium

Ce métabolite a été utilisé d'une part en raison des travaux de CLARKE et coll. (273) et de la possibilité d'un réarrangement moléculaire, d'autre part parce qu'il est libéré en grande quantité au cours de l'effort et qu'il pourrait être la cause des variations des enzymes plasmatiques à la suite d'un exercice.

Nous avons donc ajouté une quantité de lactate de sodium conduisant à une concentration finale de 100 mmol/l. Le lactate a été amené à un pH tel que la solution dans laquelle baigne le muscle, soit à pH 7,0 ou 6,5. Deux pH ont été essayés parce qu'au cours de l'effort la libération d'acide lactique se traduit par un abaissement du pH. Il fallait déterminer si l'action provenait du lactate lui-même ou de la variation de pH qui est associée à son augmentation plasmatique.

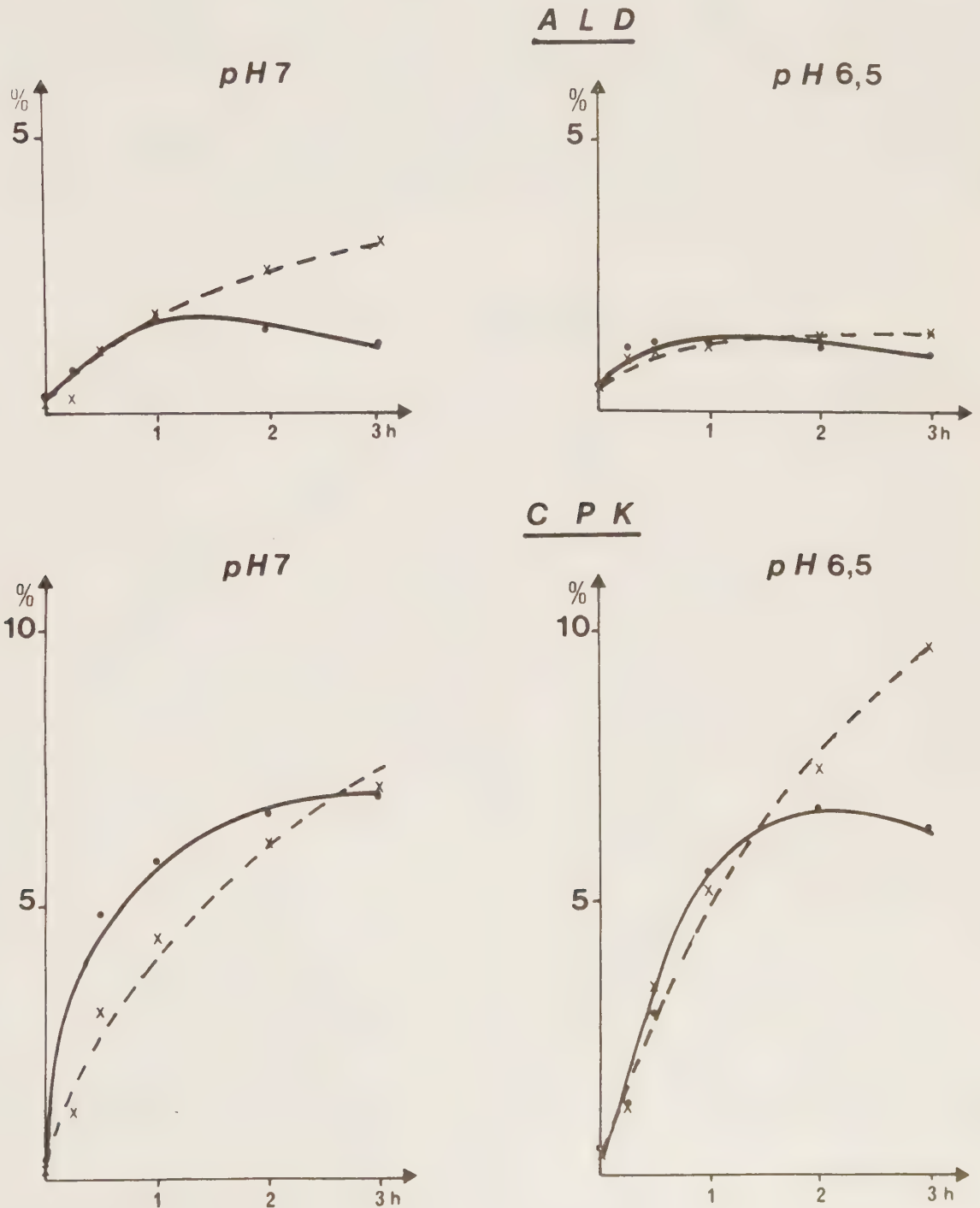


Figure 28 : Sortie d'ALD et CPK du muscle entier de rat : influence de l'addition de lactate à pH 6,5 et 7
(x-x) témoin (•-•) essai

Pour l'ALD, on observe au cours de la première heure une libération d'enzyme identique pour le muscle témoin et le muscle traité au lactate, puis l'activité enzymatique du milieu avec lactate diminue.

Pour la CPK, au cours de la première heure, la sortie d'enzyme est sensiblement supérieure pour le muscle en milieu surchargé en lactate surtout à pH 7,0 puis comme pour l'ALD, l'activité de la CPK diminue et au bout de trois heures, l'activité obtenue dans le milieu baignant le muscle en présence de lactate est inférieure à celle obtenue pour le milieu-témoin. Ceci est surtout sensible à pH 7,0 pour l'ALD et à pH 6,5 pour la CPK. Une faible variation de pH se traduit donc par des modifications importantes de la sortie des enzymes. Il semble y avoir une inhibition ou une dénaturation de l'enzyme en fonction du temps. Ici comme dans toutes les autres expérimentations, nous avons vérifié que l'addition de lactate au milieu ne provoquait aucune inhibition immédiate des enzymes, les mesures avant et après surcharge en lactate étant identiques.

PROTEINES

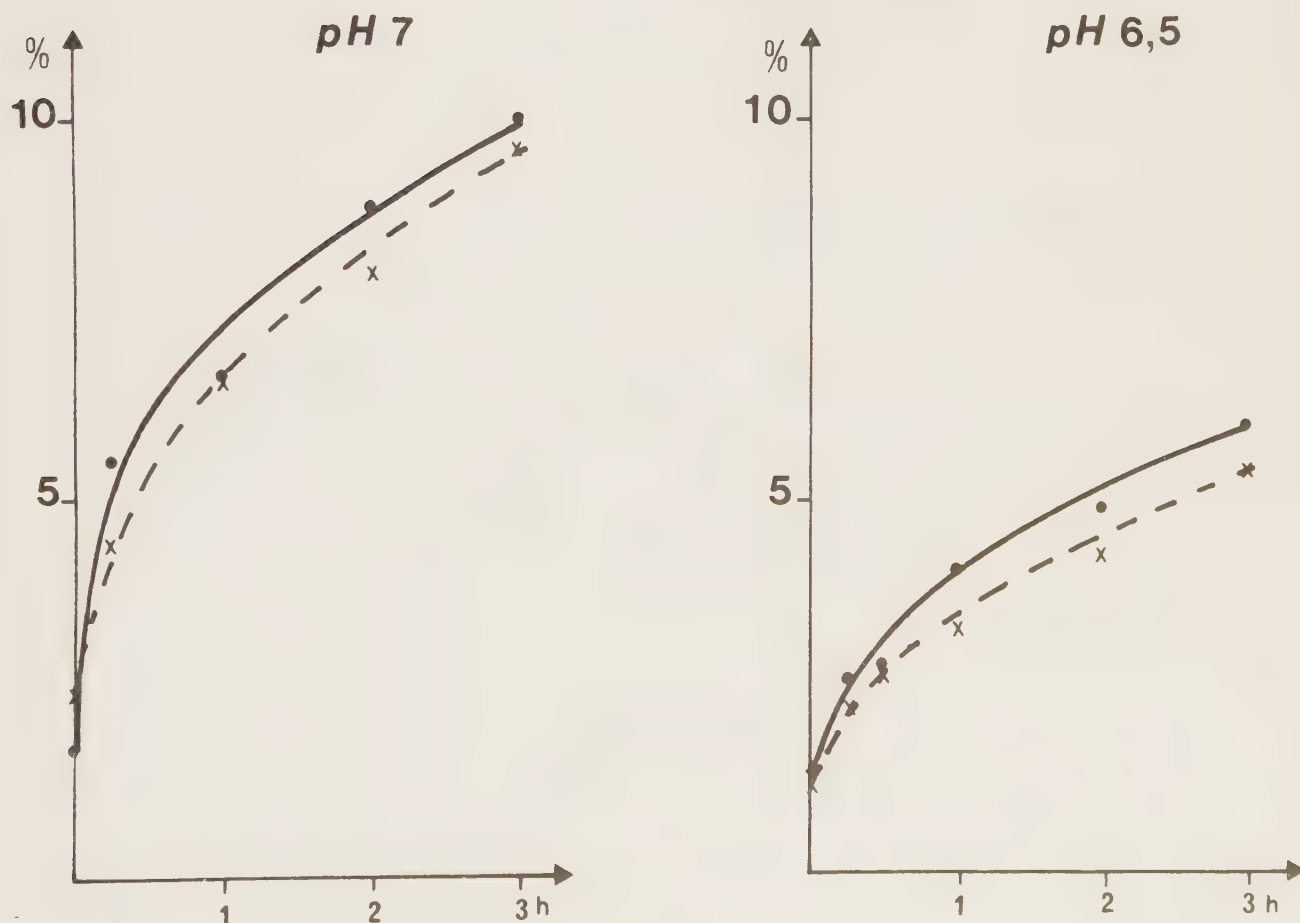


Figure 29 : Sortie de protéines du muscle entier de rat. Influence de l'addition de lactate à pH 6,5 et 7
(x--x) témoin (•—•) essai

Les variations des protéines sont très peu importantes. A pH 7,0 et 6,5, le lactate n'entraîne la libération que d'une quantité négligeable de protéines (de 0,5 % environ).

L'addition de lactate dans le milieu extérieur n'a donc que peu d'influence sur la sortie des enzymes et des protéines in "vitro" dans nos conditions de travail.

La concentration de 100 mmol est considérable en regard par exemple de celle qui peut être atteinte dans le plasma au cours d'un effort (de 5 à 10 mmol). Cependant elle n'est pas extraordinaire par rapport à la concentration intramusculaire du lactate à la suite d'un exercice.

L'action du lactate n'est donc pas nette et mérite des investigations plus approfondies.

8.2.2.4. Glucose

Il a été ajouté au milieu de Krebs-Ringer bicarbonaté à la concentration finale de 1 g/l.

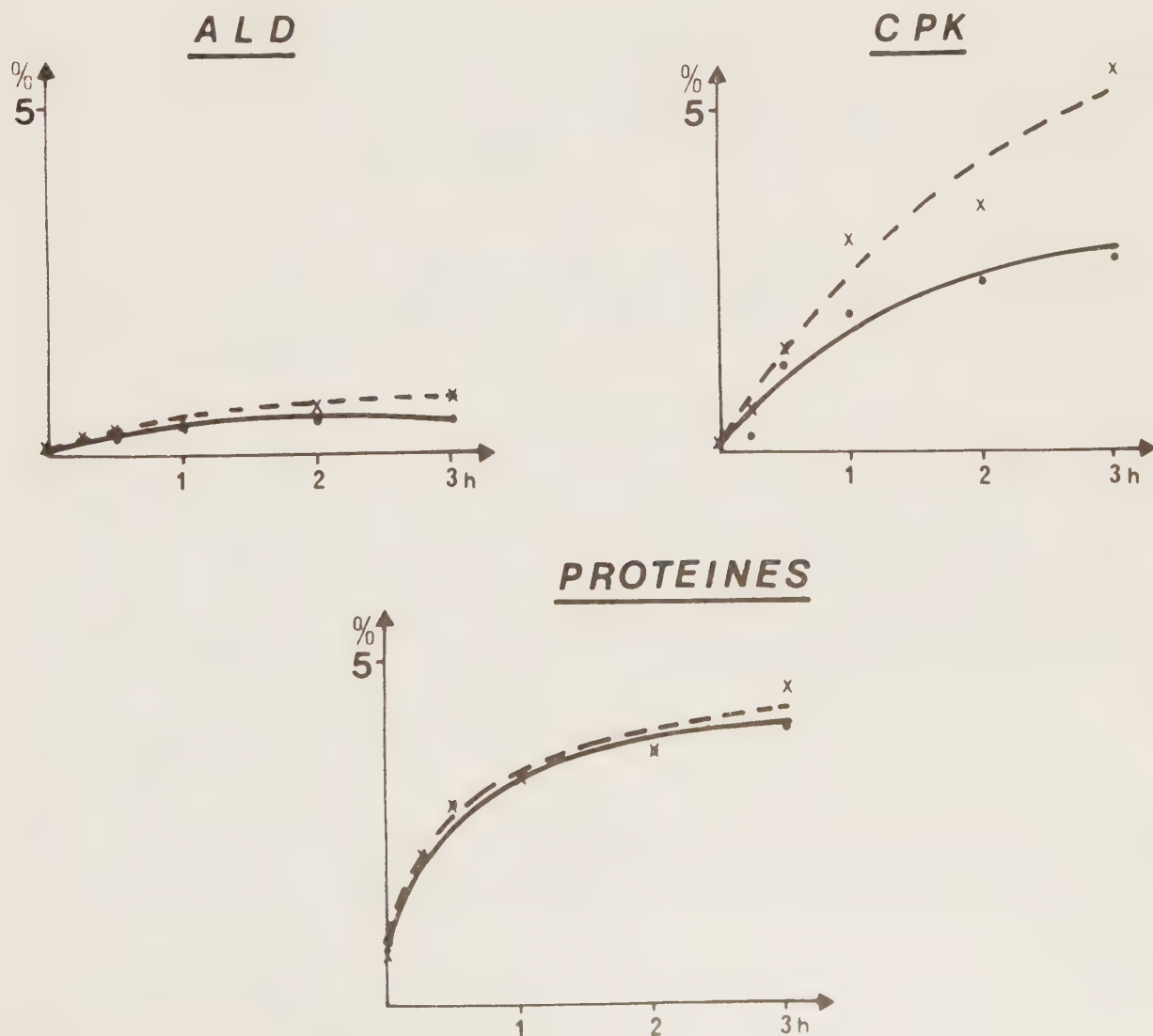


Figure 30 : Sortie des enzymes et des protéines du muscle isolé : influence du glucose à 1 g/l
(x--x) témoin (•—•) essai

L'ALD mais surtout la CPK sortent moins vite en présence de glucose. Ceci confirme les travaux de ZIERLER (226, 227, 228, 229) qui utilisait des conditions expérimentales peu éloignées des nôtres. La sortie des protéines dans notre expérimentation ne montre aucune différence. Pourtant, d'autres travaux (400) ont montré qu'en présence de glucose, la sortie des protéines des granulocytes isolés est diminuée de 40 %. En effet, la consommation du glucose évite la dégradation des constituants cellulaires, du glycogène en particulier, et permet le maintien d'une certaine "capacité métabolique". La mesure des enzymes, plus sensible que celle des protéines, l'a mis en évidence.

L'influence des substrats sur la sortie des enzymes musculaires a été effectuée dans des conditions peu éloignées des conditions physiologiques. Toutes les substances utilisées sont présentes dans l'organisme. Seules les concentrations ont été fortement augmentées.

8.2.3. INFLUENCE DES DETERGENTS

Afin d'exagérer les phénomènes observés, nous avons testé l'action du Triton X 100, détergent bien connu d'une part pour faciliter la solubilisation des enzymes, en particulier membranaires, d'autre part pour perturber les structures lipoprotéiques et modifier aussi la perméabilité. Son action sur le décrochement des enzymes a été étudiée au chapitre VI. Nous étudions maintenant ces deux actions.

Nous avons testé des concentrations en Triton X 100 de 0,5 - 0,8 - 1 - 1,5 et 2 ‰. Des concentrations plus élevées inhibent fortement les mesures d'activité enzymatique et entraînent la formation d'un précipité abondant du réactif de Folin-Ciocalteu lors du dosage des protéines, rendant celui-ci impossible.

Il se produit un accroissement de la sortie d'ALD en présence de Triton X 100 (figure 31). L'augmentation est fonction de la concentration en détergent. En effet, il y a une différence au bout de 3 h entre essai et témoin de 5, 8 et 18 % lorsque le Triton X 100 passe de 0,5 à 0,8 puis 1 ‰. Cependant lorsque la concentration en surfactif augmente encore et atteint 1,5 et 2 ‰, la sortie d'ALD n'augmente plus mais est au bout de 3 h de 9 et 7 %. Il se produirait donc une dénaturation de l'enzyme sous l'action de fortes concentrations en Triton X 100. Ceci n'a pas pu être mis en évidence par les essais de surcharge que nous avons effectués.

En ce qui concerne la CPK (figure 32), le Triton X 100 provoque le même phénomène.

La concentration de 1 ‰ est la plus efficace puisque la différence avec le témoin atteint 23 % au bout de 3 h. Puis au fur et à mesure que le taux de Triton X 100 augmente, l'activité de la CPK libérée est moindre.

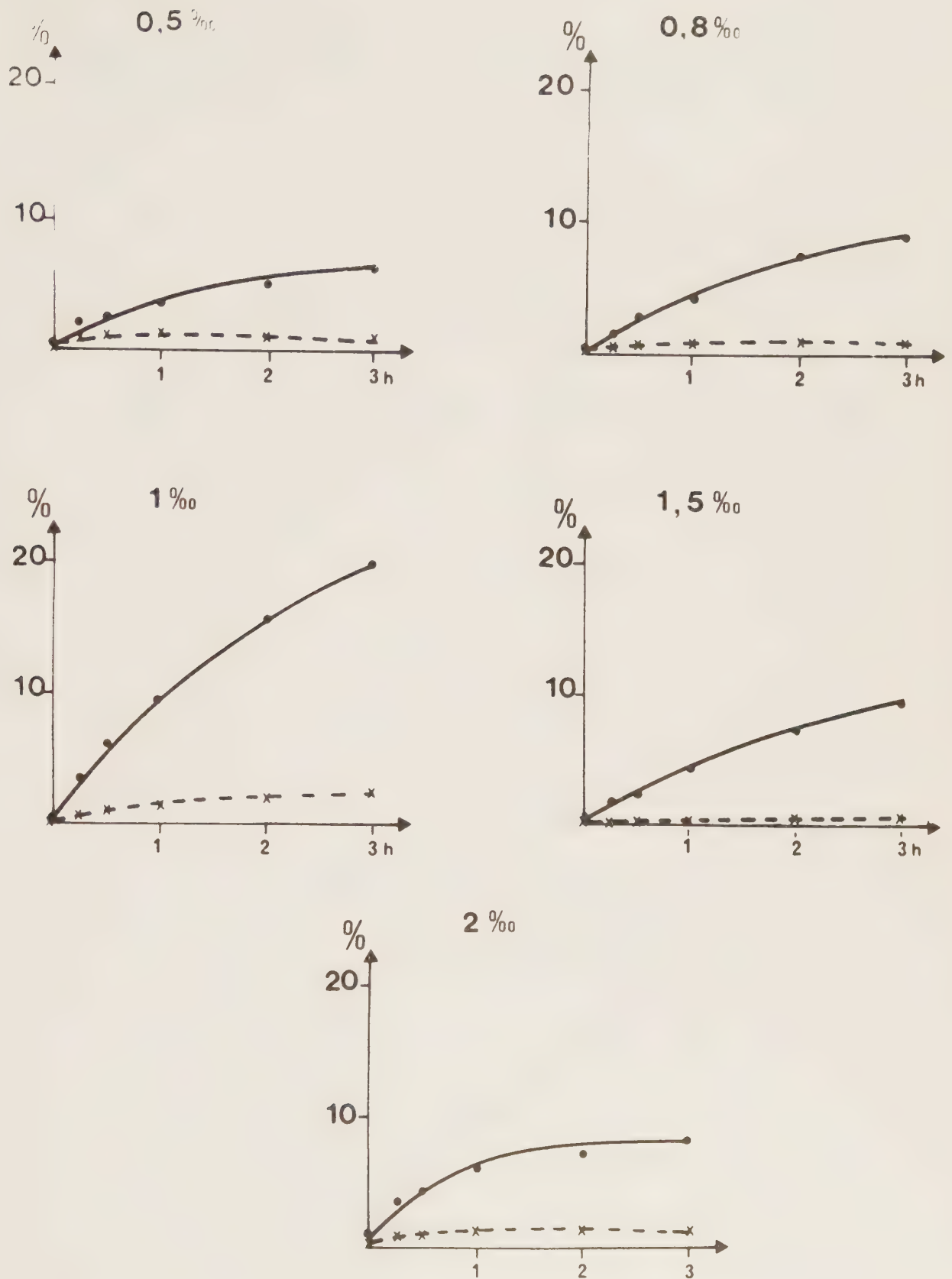


Figure 31 : Sortie d'ALD du muscle isolé. Influence du Triton X 100.
(x---x) témoin (●—●) essai

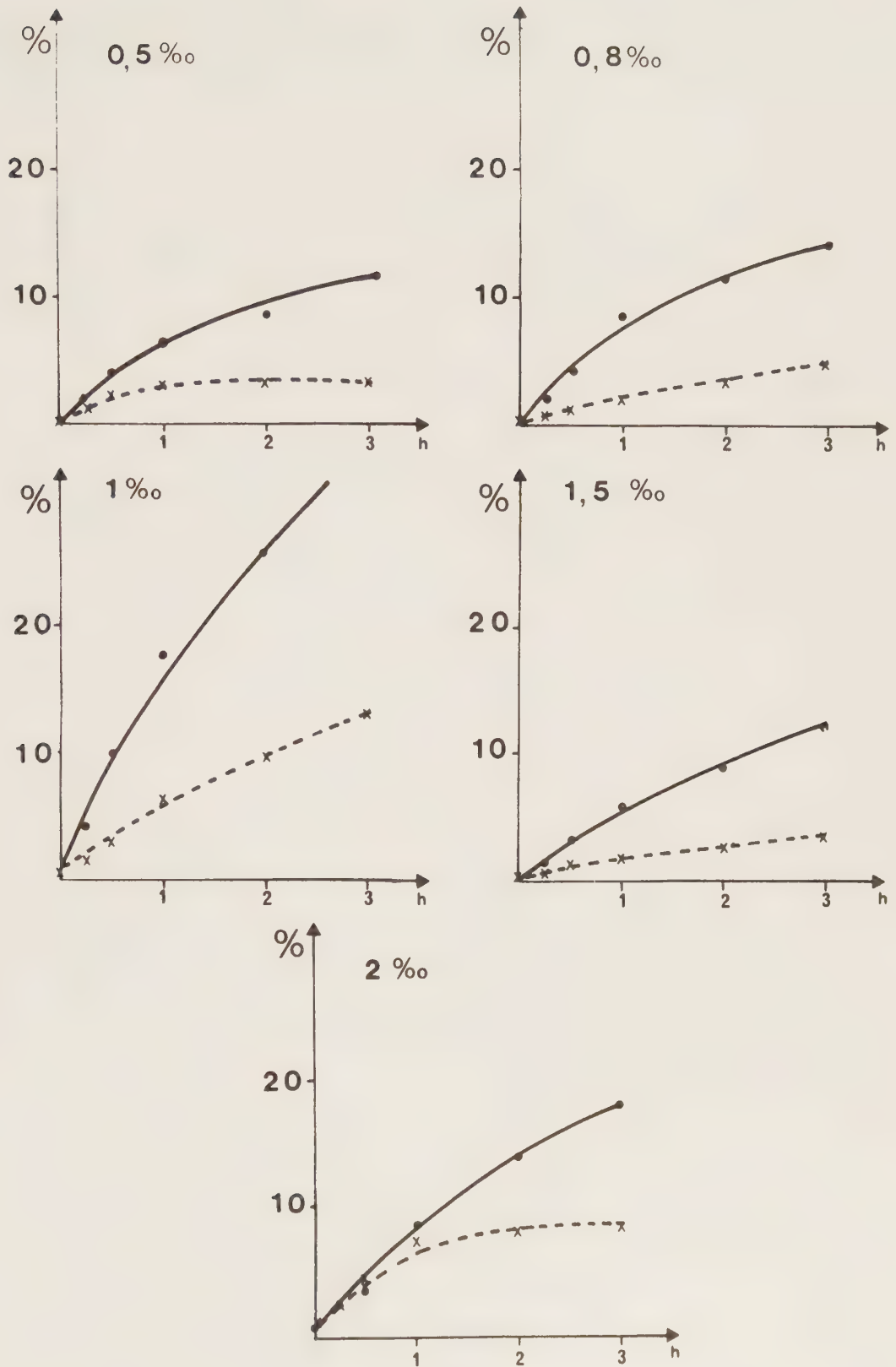


Figure 32 : Sortie de CPK du muscle isolé. Influence du Triton X 100 à différentes concentrations
(x- - -x) témoin (●—●) essai

La quantité maximale de protéines (22 %) est aussi extraite par du Triton X 100 à 1 ‰ (figure 33). Comme pour les enzymes, le niveau extrait baisse un peu (18 et 20 %) mais très peu et reste du même ordre de grandeur.

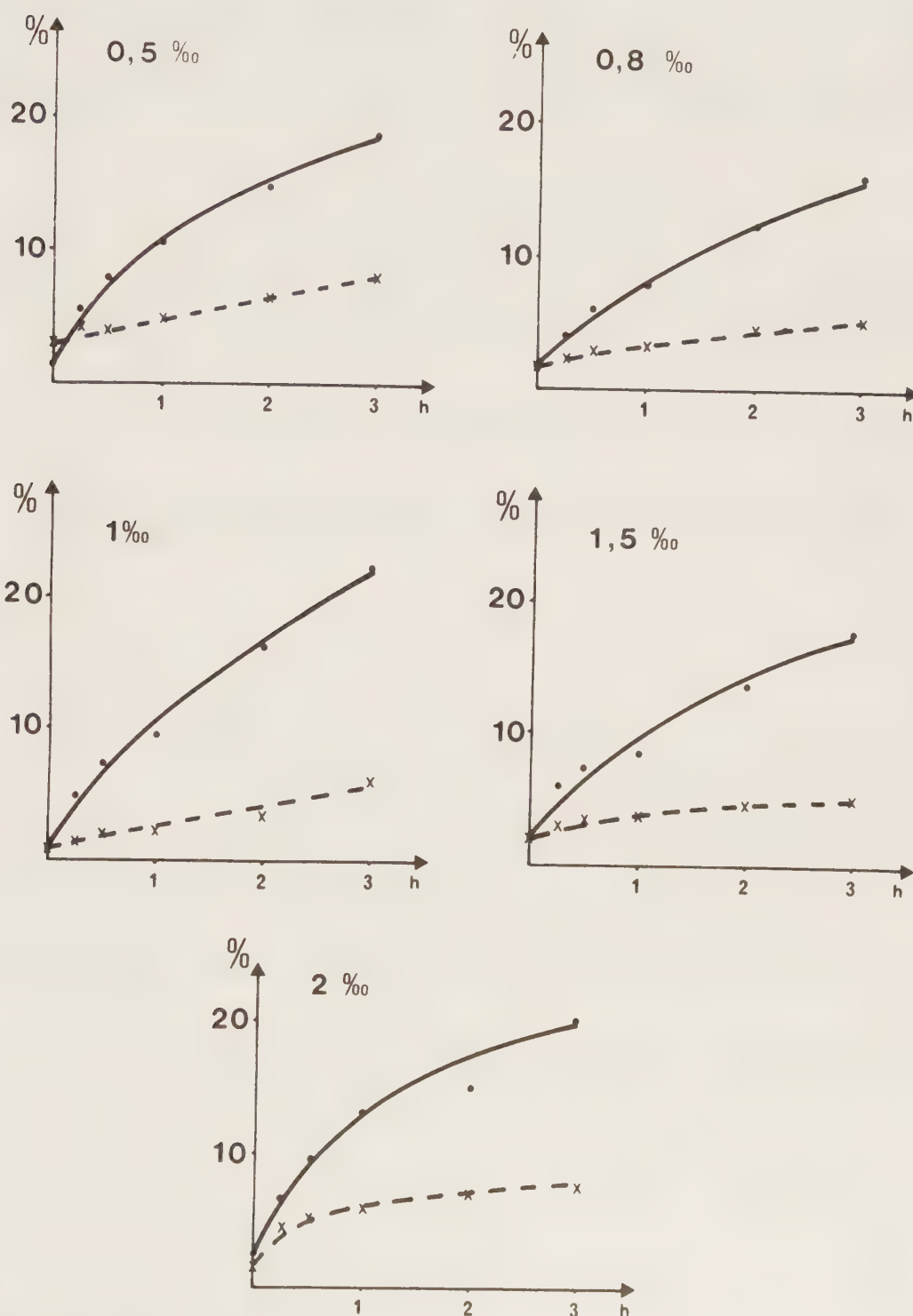


Figure 33 : Sortie des protéines du muscle isolé. Influence du Triton X 100 (x-x) témoin (•-•) essai

Ces résultats montrent que le Triton X 100, détergent neutre, décroche et facilite le passage à travers les membranes des enzymes et des protéines. Ceci est en accord avec les observations de nombreux auteurs, *in vivo* ou *in vitro*.

L'action de ce détergent a été testée en présence de fructose 1-6 diphosphate qui, comme nous l'avons vu, entraîne la libération de faibles quantités d'enzymes et de protéines à la concentration de 1 mmol/l. En effet, nous avons voulu savoir s'il y avait un effet cumulatif des deux substances. C'est pourquoi nous avons ajouté des quantités telles que la concentration finale en substrat soit de 1 mmol et en détergent de 1 ‰.

Les résultats sont regroupés sur la figure 34.

Le mélange fructose-1-6 diphosphate, Triton X 100 n'a pas une action cumulative. En effet, si le Triton à 1 ‰ est capable de libérer en 3 h 18 % de l'ALD et 23 % de la CPK lorsqu'il est seul, en présence de fructose 1-6 diphosphate il n'y a plus que 8 % d'ALD et 7 % de CPK dans le milieu extérieur au bout du même temps.

En ce qui concerne les protéines, les pourcentages de libération sont équivalents.

Le fructose 1-6 diphosphate joue donc en présence de Triton, le rôle de stabilisant de l'ALD et la CPK.

8.2.4. EFFET DES MEDICAMENTS

Enfin, de nombreuses molécules médicamenteuses sont connues pour provoquer *in vivo* une augmentation de certaines enzymes plasmatiques (401, 402). *In vitro*, il a été montré que de nombreux médicaments étaient capables de fragiliser les membranes des mitochondries, des lysosomes et même des microsomes et de provoquer ainsi une libération des enzymes. De plus, certains médicaments administrés à des rats augmentent leur capacité d'effort (64).

Nous avons choisi d'étudier sur le muscle dans les conditions décrites précédemment, l'effet de deux types de médicaments :

- . les biguanides hypoglycémiantes
- . et les psycholeptiques, connus pour leurs effets membranaires.

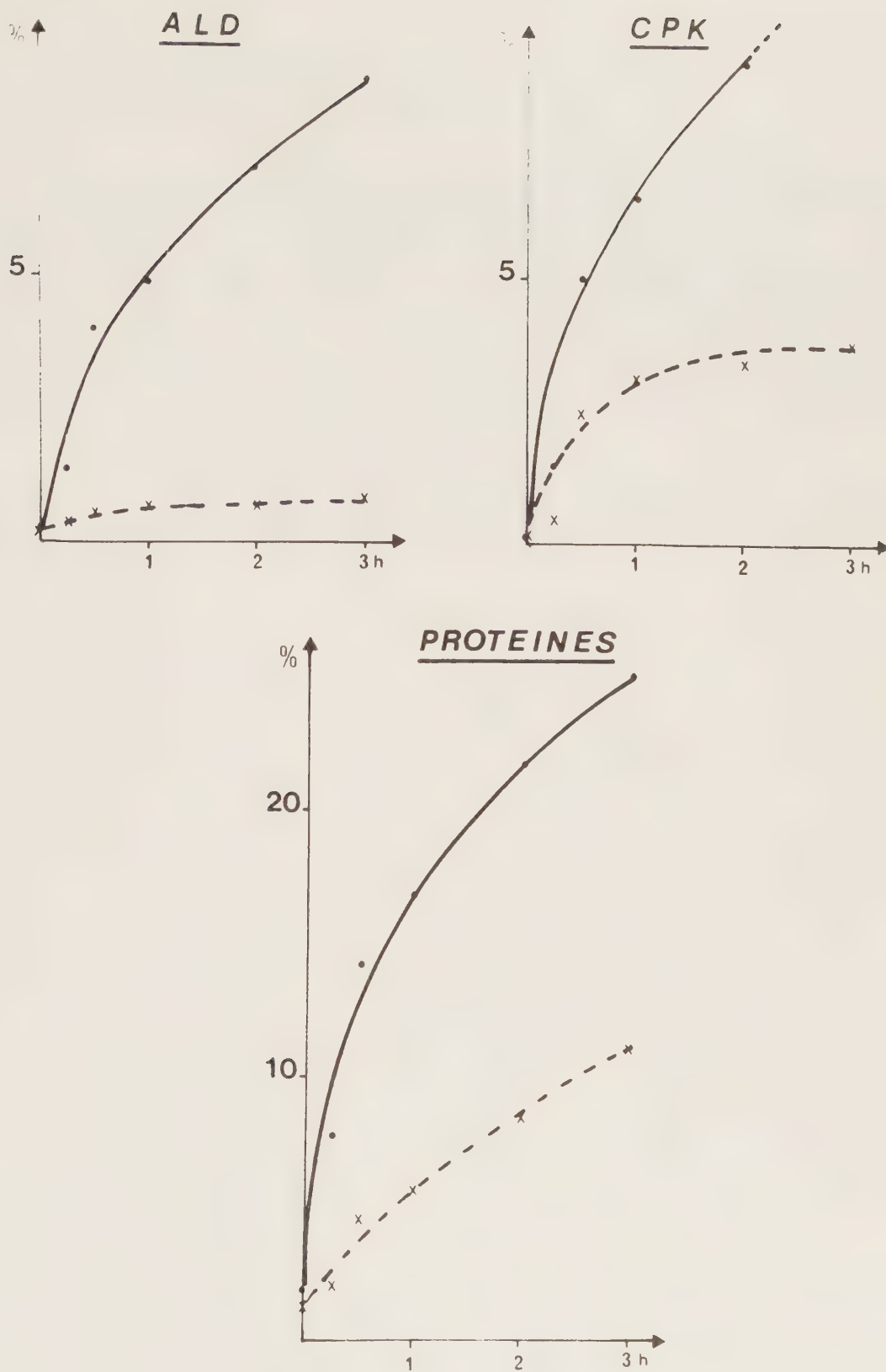


Figure 34 : Sortie d'enzymes et de protéines du muscle isolé. Effet du Triton X 100 en présence de fructose 1-6 diphosphate
(x--x) témoin (●—●) essai

8.2.4.1. Biguanides hypoglycémiantes

Le mécanisme d'action de deux biguanides hypoglycémiantes, le diméthylbiguanide et le phényléthylbiguanide, a déjà été étudié dans notre laboratoire. Il a pu être mis en évidence par des essais *in vivo* chez le rat et *in vitro* sur des mitochondries isolées (363) de foie de rat que ces médicaments inhibaient la néogluconéogenèse hépatique et provoquaient une fragilisation de la membrane mitochondriale facilitant la sortie de GOT. De plus, ces médicaments induisent chez l'homme, au cours du traitement du diabète, une acidose lactique. Ces deux phénomènes, libération des enzymes et acidose lactique, se produisant au cours de l'effort, il nous a paru intéressant de savoir si ces molécules avaient une action sur la sortie des enzymes musculaires.

Pour cela, nous avons ajouté à l'un des muscles en expérimentation du diméthylbiguanide en concentration finale de 0,1 mol/l. (figure 35).

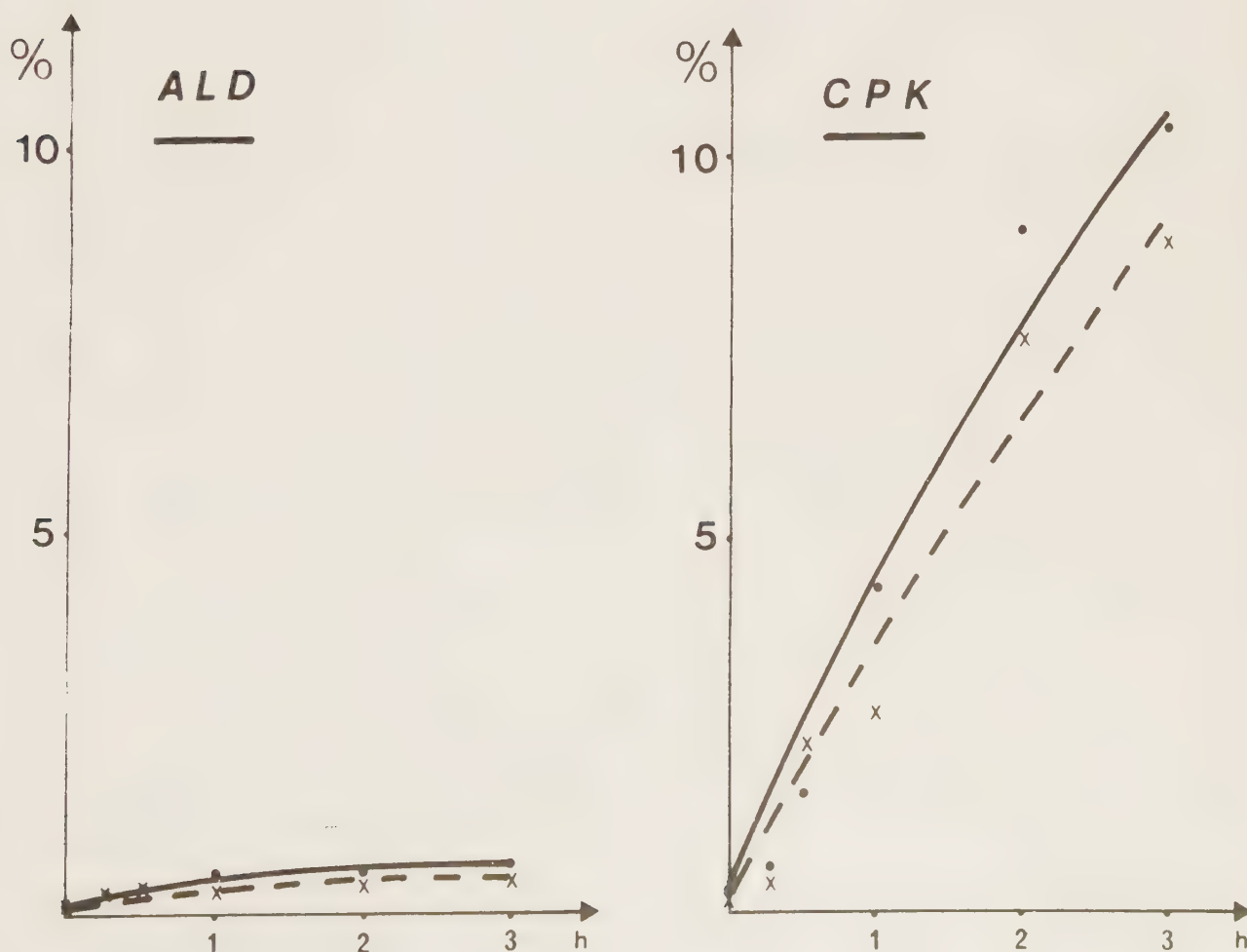


Figure 35 : Sortie des enzymes du muscle isolé : Influence du diméthylbiguanide.
(x - x) témoin (• — •) essai

Nous n'avons observé aucun effet sur la sortie des enzymes du muscle.

Par contre, le phényléthylbiguanide provoque une augmentation de l'ALD et de la GOT dans le milieu baignant le muscle. La sortie d'ALD est fonction de la concentration. (figures 36 et 37)

ALD

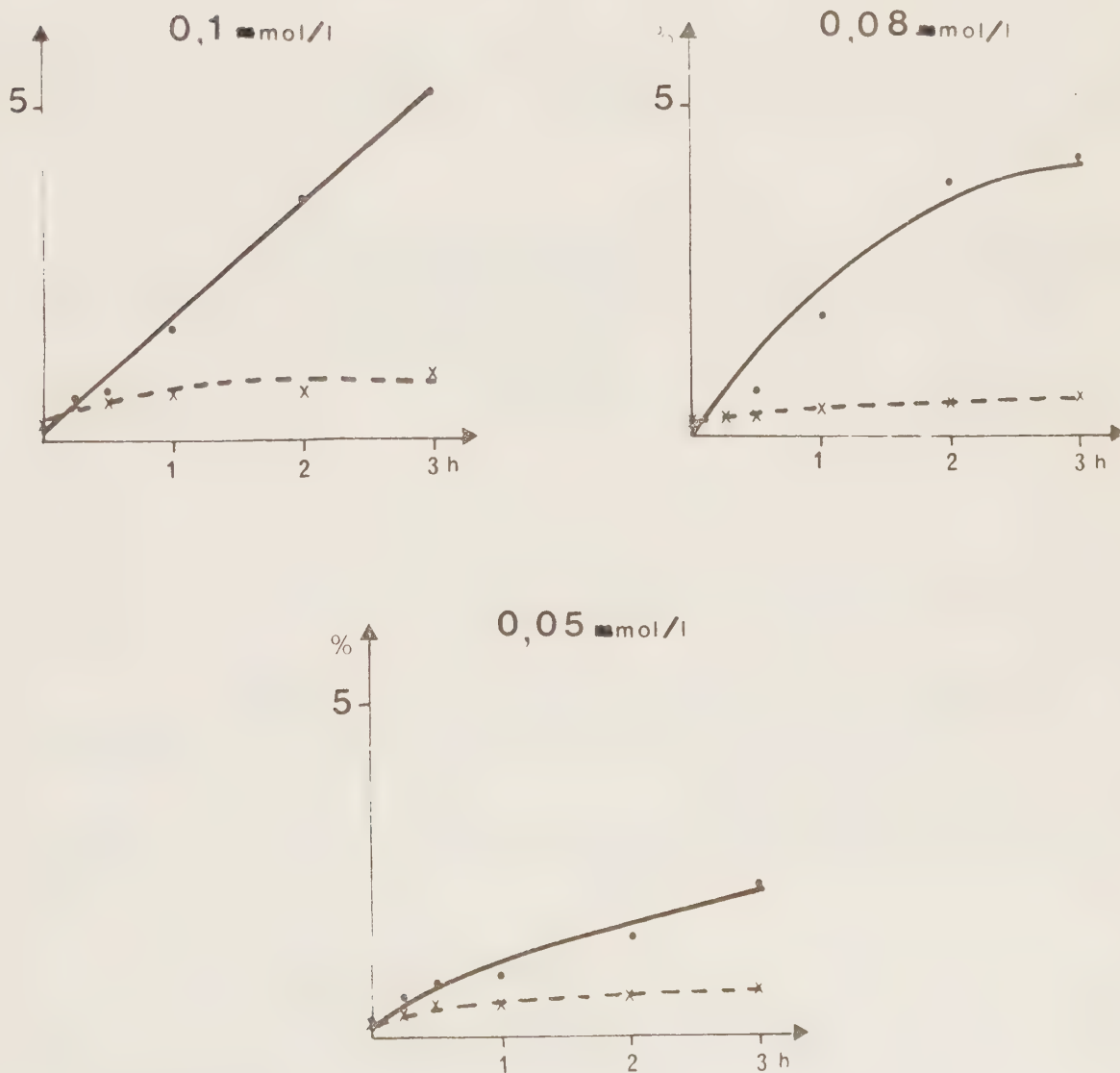


Figure 36 : Sortie des enzymes du muscle isolé : Influence du phényléthylbiguanide
(x--x) témoin (●—●) essai

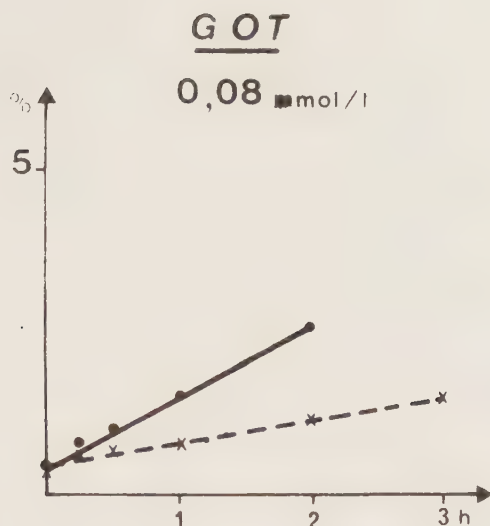


Figure 37 : Sortie d'enzymes du muscle isolé. Effet du phényléthylbiguanide
(x - x) témoin (•—•) essai

Ces essais confirment donc ceux déjà trouvés au laboratoire sur des mitochondries isolées de foie de rat (363). Le diméthylbiguanide était aussi sans action alors que le phényléthylbiguanide provoquait une sortie importante de GOT mitochondriale.

Comme sur les mitochondries de foie de rat, le phényléthylbiguanide a pour effet une fragilisation de certaines structures membranaires du muscle.

8.2.4.2. Psycholeptiques

Ces médicaments, très utilisés, peuvent être divisés en trois grandes classes : les hypnotiques, les neuroleptiques et les tranquillisants.

Beaucoup de ces composés sont connus pour provoquer des augmentations des enzymes in vivo (183, 191, 403) ou in vitro (239), en particulier de la CPK, enzyme très largement musculaire.

Nous avons testé sur le muscle isolé, une molécule appartenant à chacun des groupes pré-cités. Nous les avons ajustées à la concentration finale de 10^{-5} mol/l.

- Phénobarbital sodique

Ce médicament provoque une diminution des activités enzymatiques et du taux de protéines du milieu extérieur. Son action peut s'expliquer soit par une stabilisation des membranes avec une diminution de la perméabilité, effet inverse de celui que nous recherchons, soit par une inhibition des méthodes de dosages. En ce qui concerne la seconde hypothèse, nous n'avons pas pu mettre en évidence une inhibition des réactions enzymatiques par surcharge, même lorsque les activités ne sont mesurées qu'après 3 h de contact enzymes-médicament.

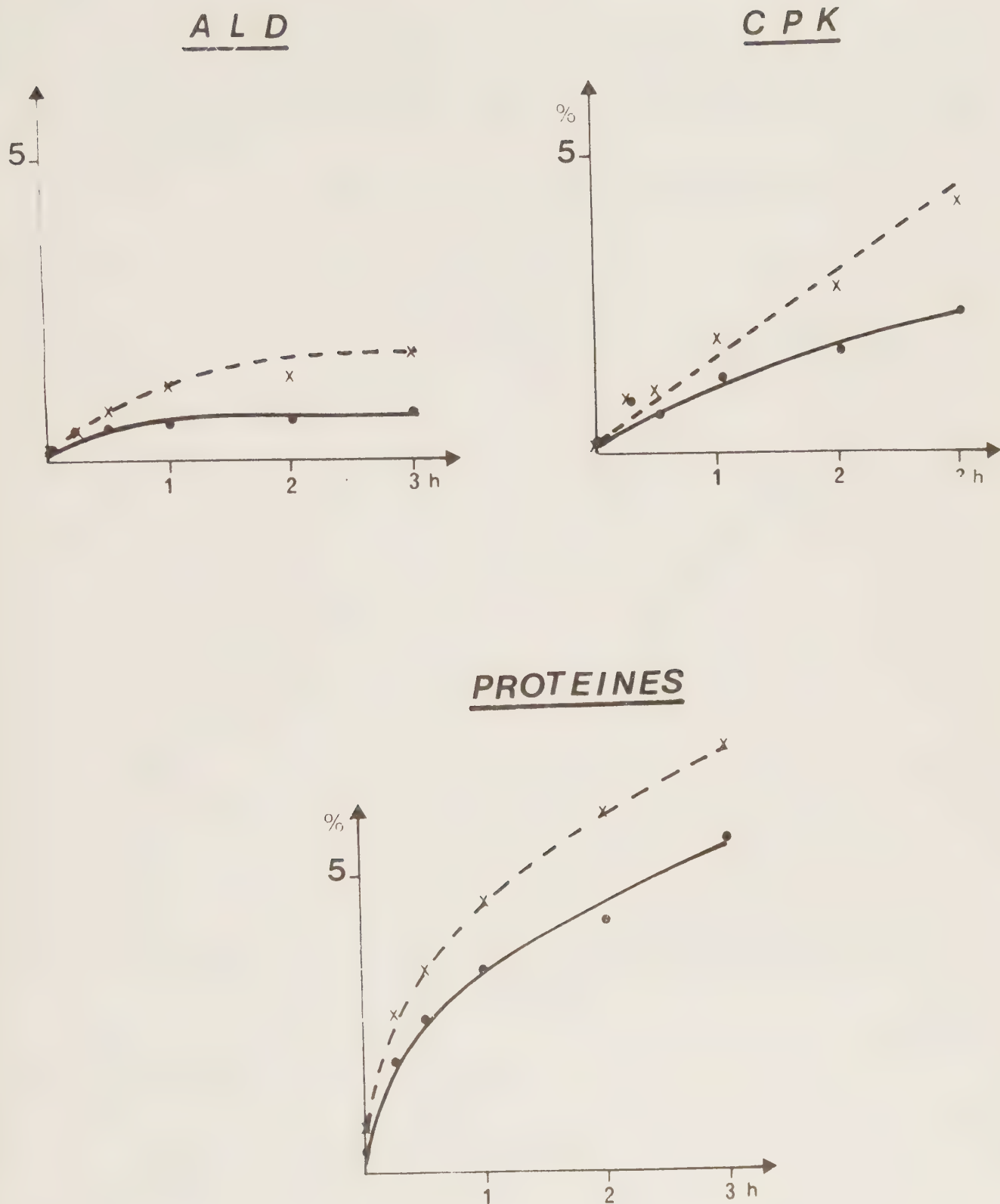


Figure 38 : Sortie d'enzymes et de protéines du muscle isolé de rat sous l'influence du phénobarbital sodique 10^{-5} mol.
(x--x) témoin (●—●) essai.

- Chlorhydrate de prométhazine (phenergan)

Ce médicament interfère considérablement dans les mesures d'activité enzymatique de l'ALD et de la CPK. Son action n'a donc pas pu être testée.

- Chlorhydrate de chlordiazépoxyde (librium)

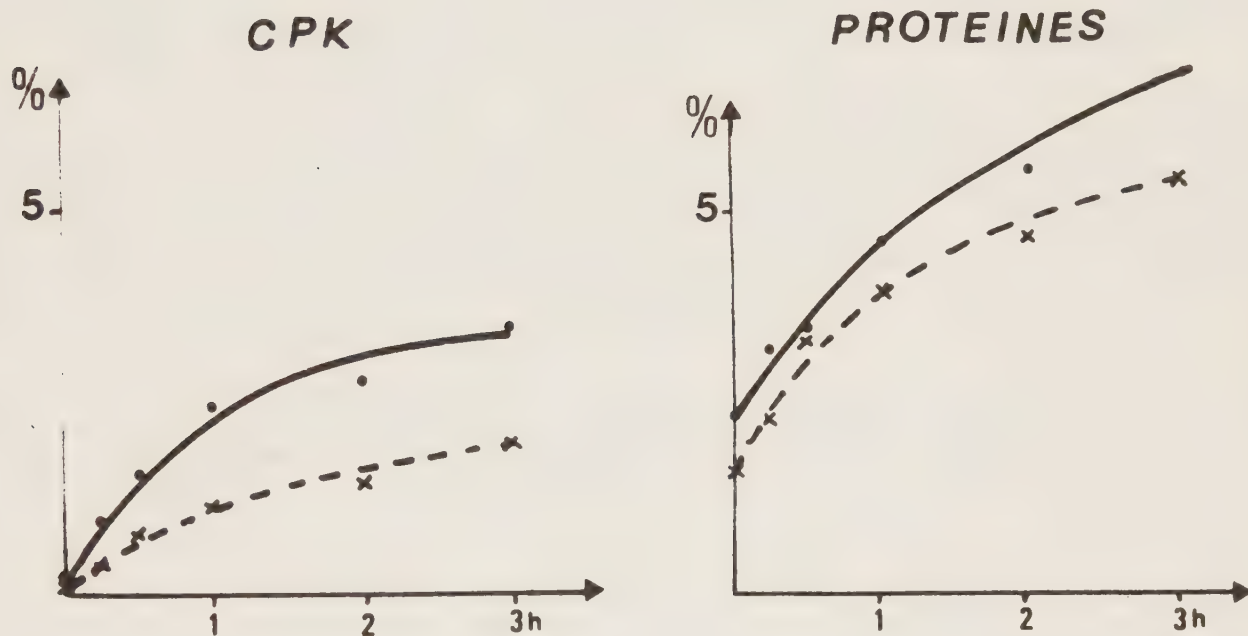


Figure 39 : Sortie d'enzymes et de protéines du muscle isolé : influence du chlorhydrate de chlordiazépoxyde (librium)

(x---x) témoin (•—•) essai

A la concentration de 10^{-5} mol/l, ce composé provoque une libération de CPK et de protéines.

Le librium produit une inhibition d'environ 35 % de l'activité de l'ALD et son effet sur la sortie de cette enzyme n'a donc pas pu être étudié.

Nous avons donc mis en évidence qu'un muscle de rat prélevé en totalité et placé dans un milieu de survie laisse sortir "normalement" une faible quantité d'enzymes et de protéines. Nous avons donc là un modèle pour l'étude de la sortie des enzymes meilleur que les cellules musculaires isolées. Toutes nos expérimentations ont montré que l'ALD sort toujours moins rapidement que la CPK. Rappelons que la première est liée aux protéines de structure (F-actine en particulier) alors que la seconde est essentiellement cytoplasmique.

Le fructose 1-6 diphosphate ajouté aux concentrations de 0,01 - 0,1 - 1 et 10 mmol/l provoque une sortie d'ALD. La libération d'enzyme est maximum avec 1 mmol, les autres concentrations n'ayant pas d'effet visible. La CPK est libérée avec les trois premières concentrations puis il se produit une stabilisation avec 10 mmol/l et la sortie est diminuée. Les protéines sont libérées par toutes les concentrations de ce substrat, 1 mmol/l provoquant la sortie la plus importante.

Le créatine phosphate à trois concentrations (1 - 10 et 100 mmol/l) n'a aucun effet sur la sortie d'ALD. Par contre, la CPK est libérée en grande quantité avec 10 et 100 mmol/l. Il y a peut être une stabilisation pour les concentrations inférieures. En effet, avec 1 mmol/l il n'y a plus de sortie d'enzymes. A cette concentration, il se produit une diminution de la sortie des protéines puis avec 10 mmol/l il n'y a aucun effet. Enfin, 100 mmol/l provoquent une très importante sortie de protéines.

Le lactate à pH 7,0 et 6,5 n'a aucun effet sur la sortie d'ALD. Au contraire, il se produit une inhibition de l'enzyme avec le temps. Pour la CPK, on observe d'abord une sortie de l'enzyme puis ici encore il y a une inhibition. La sortie des protéines enfin est peu affectée par l'addition de lactate.

Le glucose a peu d'effet sur la sortie d'ALD et des protéines alors qu'il provoque une importante diminution de la libération de la CPK. En tant que substrat énergétique, il aide au maintien des structures membranaires et inhibe donc la sortie "normale" de CPK qui est relativement importante par rapport par exemple à celle de l'ALD.

Le Triton X 100 utilisé pour son action lytique sur les structures à des concentrations allant de 0,5 à 2 ‰ entraîne une libération d'enzymes et de protéines qui augmente pour des concentrations allant jusqu'à 1 ‰. Au dessus de 1 ‰ il se produit vraisemblablement une dénaturation et on retrouve moins d'activité enzymatique dans le milieu extérieur. En présence de fructose 1-6 diphosphate, le Triton X 100 à 1 ‰ est moins efficace. La sortie de CPK passe de 23 % à 7 % et celle de l'ALD de 18 à 8 %. Il y a donc une protection des enzymes par ce substrat. Cet effet est d'ailleurs spécifique puisque les protéines ne sont pas touchées.

Les médicaments dont l'étude n'a volontairement pas été développée dans ce travail pourraient être des agents spécifiques d'attaque de structures membranaires en des points déterminés. Le diméthylbiguanide n'a aucun effet sur la sortie des enzymes, tandis que le phényléthylbiguanide provoque une libération importante d'ALD et de GOT.

Enfin, le phénobarbital et les autres psycholeptiques ont des effets stabilisants ou inhibiteurs des enzymes selon la dose ajoutée.

===== CONCLUSIONS =====

La première partie de notre travail est consacrée aux variations de certains paramètres plasmatiques au cours de l'exercice. Nous avons mis en évidence que même un effort de faible intensité entraîne des modifications. En effet, le calcium, le phosphore, les protéines totales, sont significativement augmentés alors que l'urée ou le glucose sont toujours diminués. Nous n'avons pu montrer aucune différence significative de la réponse à l'effort entre une population de sujets non entraînés et des sportifs entraînés. Après l'étude des variations des petites molécules, celle des enzymes prouve que cette épreuve d'effort, bien que modérée, est capable de provoquer des augmentations de la PA, la GOT, la GPT, la LDH, la MDH, l'ALD et la CPK.

Cet effort se traduit donc par des modifications plasmatiques dont il faut tenir compte lors de l'interprétation des examens biologiques effectués au laboratoire d'analyses médicales. En particulier, avant de mesurer certains composés, il sera nécessaire de s'assurer que le sujet ne vient pas de pratiquer un effort.

Dans le cadre du Centre de Médecine Préventive de Vandoeuvre-lès-Nancy, cet exercice pouvait être utilisé comme moyen "d'agression" de l'organisme donc comme épreuve d'exploration fonctionnelle. Mais avant de pouvoir l'employer ainsi, il fallait être sûr de sa validité. C'est ce que nous avons tenté de démontrer en étudiant les variations à l'effort des différents paramètres en fonction de l'âge, du sexe, du poids et de l'entraînement des sujets. Les modifications dues à l'effort ne semblent pas être influencées par ces facteurs.

Cette épreuve ne paraît donc pas suffisante pour provoquer un déséquilibre permettant de détecter une déviation légère de l'état de santé.

Nous avons également mis au point une méthode de mesure en continu in vivo de la CPK. Nous avons pu effectuer trois mesures en continu au cours d'un exercice intense chez des sportifs. Le niveau du lactate déterminé simultanément permet de rendre compte de l'intensité de l'épreuve. Les résultats obtenus ne mettent en évidence qu'une légère augmentation au début de l'épreuve puis une faible diminution à la fin. Il est probable que chez ces sportifs entraînés, le niveau de départ très élevé n'ait pas permis de démontrer une augmentation significative de la CPK et que l'intensité de l'effort soit encore insuffisante pour ces athlètes. Cette expérimentation n'a donc pas conduit aux résultats escomptés mais elle a prouvé la complexité des mécanismes de régulations physiologique et hormonale qui sont un obstacle à l'étude in vivo du phénomène de libération des enzymes cellulaires.

Il faudrait pour utiliser l'effort comme épreuve d'exploration fonctionnelle chez l'homme non entraîné dans un but de prévention ou de détection de certaines maladies, faire pratiquer un exercice plus intense et surtout de plus longue durée. Il serait utile de plus d'examiner les dossiers des sujets présentant des variations à l'effort très différentes de la moyenne du groupe de même sexe et de même âge afin d'y rechercher d'autres "anomalies" éventuelles.

Mais il ne suffit pas d'observer des variations qui, dans notre étude, sont peu importantes, mais peuvent être considérables à la suite d'un effort très intense. Il faut essayer de trouver une explication biochimique à ce phénomène dont les mécanismes sont peu connus.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons abordé cette étude à un échelon moins complexe que l'homme ou l'animal entier. Le but de cette expérimentation in vitro est de vérifier l'incidence de certains métabolites sur le phénomène de sortie de protéines et plus particulièrement sur les liaisons protéine-protéine intracellulaires. En effet, les études des enzymes des complexes membranaires et des organites subcellulaires, montrent que les enzymes sont attachées à l'intérieur de la cellule à d'autres enzymes, à du matériel protéique ou lipoprotéique. L'effort pourrait provoquer une rupture de ces liaisons par action directe d'un substrat ou indirectement par modifications de réactions métaboliques.

Après avoir défini le contenu en enzymes et isoenzymes du muscle gastrocnémien de rat, nous avons abordé le problème "du décrochement" des enzymes musculaires par des techniques d'extraction. Grâce à cette méthode, nous avons pu mettre en évidence que des variations de pH ou de force ionique se traduisent par une "solubilisation" des enzymes. Cette extraction est plus ou moins difficile selon la localisation et surtout le type de liaison auquel participe la protéine enzymatique. Ainsi l'ALD dont la liaison à la F-actine est bien connue en solution pure est difficile à libérer de ses structures et les modifications de son extraction à la suite de variations de pH ou autres sont très importantes. La LDH cytoplasmique liée moins fortement à des structures subcellulaires, est plus facile à "décrocher" que la CPK, en faible partie mitochondriale. L'influence de certains cations, anions ou détergents est aussi très importante et se traduit par "une solubilisation" des enzymes qui se fait dans le même ordre que précédemment. L'addition de métabolites comme le lactate peut également entraîner des modifications dans le rendement de l'extraction de certaines enzymes. Ces techniques nous ont donc permis de mettre en évidence des différences importantes dans les liaisons des enzymes dites "cytoplasmiques". Cependant les méthodes d'extraction sont

trop drastiques et ne permettent pas d'apprécier des variations fines. De plus, elles n'explorent que la phase de "solubilisation, décrochement" des enzymes alors que dans une cellule, celle-ci n'est que la première phase à laquelle succède un passage transmembranaire vers le milieu extracellulaire.

Nous avons tenté alors de mettre au point des techniques moins grossières, plus proches des conditions physiologiques : séparation, dissociation de fibres musculaires par traitement à la collagénase. Après vérification de leur viabilité, nous avons étudié la sortie des enzymes. L'influence du lactate a été testée. Il y a une faible augmentation de la sortie de l'ALD à pH 7 mais l'interprétation est difficile car il se produit une libération massive des enzymes dès le début de la mise en survie. La viabilité de ces cellules reste donc à améliorer.

Nous avons enfin utilisé le muscle isolé entier de rat pour la suite de cette étude. Le fructose 1-6 diphosphate à différentes concentrations provoque une libération d'ALD et de CPK. Par contre, le créatine phosphate n'a aucun effet sur la sortie de l'ALD alors que la CPK est libérée en grande quantité. L'apport des liaisons riches en énergie semble donc aider au maintien de la liaison ALD-protéines musculaires alors que la CPK, dont le créatine phosphate est un des substrats spécifiques, est plus facilement libérée. La CPK ayant plus d'affinité pour son substrat que pour les protéines auxquelles elle est liée, est "décrochée" et trouvée dans le milieu extracellulaire. Le lactate n'a pas d'action sur la sortie d'ALD alors que la CPK augmente dans le milieu baignant le muscle. Les protéines mesurées simultanément montrent des variations moins importantes. Ces effets sont donc spécifiques et les enzymes sont des "marqueurs" plus sensibles que les protéines pour l'étude des phénomènes de libération des macromolécules intracellulaires. Le glucose provoque une diminution de la sortie des enzymes. Son action comme substrat énergétique aide au maintien de la "capacité" métabolique et des structures organisées.

Afin d'amplifier les phénomènes, nous avons utilisé un détergent, le Triton X 100 qui est bien connu pour son action sur les lipoprotéines. Il entraîne une sortie importante d'enzymes et de protéines mais son effet est moindre en présence de fructose 1-6 diphosphate qui a donc un pouvoir de protection partielle des structures cellulaires.

Enfin pour terminer notre travail, nous avons utilisé des médicaments connus pour leur action au niveau membranaire.

Le phényléthylbiguanide provoque une libération importante d'ALD et de GOT. Ce résultat confirme celui déjà trouvé sur des mitochondries

de foie de rat dont il semble fragiliser les membranes et provoquer un efflux de GOT. Enfin, parmi les psycholeptiques, le phénobarbital sodique diminue la sortie d'enzymes et de protéines alors que le "librium" appartenant à la classe des tranquillisants, entraîne une augmentation des enzymes et des protéines du milieu extracellulaire.

A l'aide de ces différentes techniques, nous avons donc montré que des substrats sont capables de modifier les liaisons protéine-protéine intracellulaire et d'influencer ainsi la libération des enzymes cellulaires.

Ces résultats expérimentaux in vitro mettent en évidence que les techniques mises au point seront utilisables pour étudier l'impact des médicaments.

Ces résultats doivent maintenant recevoir une explication métabolique que nous n'avons pas voulu aborder ici.

o o O o o

===== BIBLIOGRAPHIE =====

- 1 - CHERASKIN E., RINGSDORF W.M.
J. Amer.Geriat.Soc., 1971, 19, 969
- 2 - HUDGSON P., GARDNER-MEDWIN D., PENNINGTON R.J.T., WALTON J.N.
J. Neurol. Neurosurg.Psychiat., 1967, 30, 416
- 3 - MOSER H., WIESMANN U.
Klin. Wschr., 1971, 49, 488
- 4 - NERDRUM H.J., NORDOY S.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1964, 16, 617
- 5 - DYBKAER R.
Quantities and Units in Clinical Chemistry
Munksgaard, 1967
- 6 - GITELMAN M.J.
Ann. Biochem., 1967, 18, 521
- 7 - KRAML M.
Clin. Chim. Acta, 1966, 13, 442
- 8 - NISHI H.H., RHODES A.
In : Automation in analytical chemistry
Technicon Symposium, 1965
- 9 - BITTNER D., McCLEARY M.
Amer. J. Clin. Path., 1963, 9, 423
- 10 - LEVINE J., MORGENSTERN S., VLASTELICA D.
In : Automation in analytical chemistry
Technicon Symposium, 1967, 1, 25
- 11 - MARSH W.H., FINGERHUT G., MILLER H.
Clin. Chem., 1965, 11, 624
- 12 - CHASSON A.L., GRADY H.T., STANLEY M.A.
Amer. J. Clin. Path., 1961, 35, 83
- 13 - MUSSER A.W., ORTIGOZA C.
Tech. Bull. Registry Med. Tech., 1966, 36, 21
- 14 - GAMBINO S.R., SCHREIBER H.
In : Automation in analytical chemistry
Technicon Symposium, 1964
- 15 - SIEST G., FLOC'H A.
In : Organisation - Automatisation des laboratoires
SIEST G. ed., Exp. Scient. Franç., Paris, 1971, p.347
- 16 - SIEST G., HOUOT O., HENNY J.
In : Contrôle de qualité des examens de laboratoire
SIMEP Ed., Lyon, 1971, p.225

- 17 - SCHWARTZ D.
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes
Flammarion Ed. Med., 1963
- 18 - LANGE DE R., BARNES J.R., BROUHA L.
J. Appl. Physiol., 1959, 14, 804
- 19 - ROUGIER G., BABIN J.P.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ., Basel, 1969, p.284
- 20 - GEORGE W.K., DOTSON D.A., GRANT W.W.
Clin. Res., 1966, 24, 62
- 21 - PRUETT E.D.R.
J. Appl. Physiol., 1970, 28, 199
- 22 - METIVIER G.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ., Basel, 1969, p.301
- 23 - BEAUMONT Van W., STRAND J.C., PETROFSKY J.S., HIPSKIND S.G., GREENLEAF J.
J. Appl. Physiol., 1973, 34, 102
- 24 - CANTONE A., CERRETELLI P.
Int. Z. angew. Physiol., 1960, 18, 107
- 25 - ALBANESE A.A., ORTO L.A., ZAVATTARO D.N.
Nutr. Rep. int., 1971, 3, 165
- 26 - HARALAMBIE G.
In : Limiting factors of physical performance
KEUL J. Ed., Georg Thieme Publ., Stuttgart, 1973, p.189
- 27 - HARALAMBIE G.
Clin. Chim. Acta, 1970, 27, 475
- 28 - POORTMANS J.R.
J. Appl. Physiol., 1971, 30, 190
- 29 - POORTMANS J.R.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ., Basel, 1969, p.312
- 30 - JOYE H., POORTMANS J.R.
Med. Sci. Sports, 1970, 2, 187
- 31 - DELFORGE E., DELFORGE B., POORTMANS J.R.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ., Basel, 1969, p.353
- 32 - POORTMANS J.R.
Physical exercise and proteins
A paraître
- 33 - HAMBERGER A., GREGSON N., LEHNINGER A.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 186, 373

- 34 - RICHTERICH R.
Chimie clinique théorique et pratique
DOIN Ed., Paris, 1967
- 35 - ROCHE M., BONHOURS G., CHOISY H., DUBOIS DE MONTREYNAUD J.M.
Ann. Med. Reims, 1971, 8, 329
- 36 - REITMAN J., BALDWIN K.M., HOLLOSZY J.O.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med.
A paraître
- 37 - SUTTON J.R., YOUNG J.D., LAZARUS L., HICKIE J.B., MARSVYTIS J.
Austr. Ann. Med., 1969, 18, 84
- 38 - PRUETT E.D.R.
In : Muscle metabolism during exercise
PERNOW B. and SALTIN B. Ed., Plenum Press Publ., New York, London,
1971, 11, p.165
- 39 - CARLSON L.A., FRÖBERG S.O.
Gerontologia, Basel, 1969, 15, 14
- 40 - TOPI G.C., GANDOLFO D'ALESSANDRO L., PIOVANO G.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ., Basel, 1969, p.96
- 41 - OSEID S., HERMANSEN L.
Acta paediat.scand., 1971, 217, 147
- 42 - NIKKILÄ E.A., TASKINEN M.R., MIETTINEN T.A., PELKONEN R., POPPIUS H.
Diabetes N.Y., 1968, 17, 209
- 43 - WRIGHT P.H., MALAISSE J.
Amer. J. Physiol., 1968, 214, 1031
- 44 - BÖTTGER I., SCHLEIN E.M., FALOON G.R., KNOCHEL J.P., UNGER R.H.
J. clin. Endocrinol. Metab., 1972, 35, 117
- 45 - FITZGERALD O., HEFFERNAN A., MCFARLANE R.
Clin. Sci., 1965, 28, 83
- 46 - HURTER R., SWALE J., PEYMAN M.A., BARNETT C.W.H.
Lancet, 1972, 30, 671
- 47 - SANNERSTEDT R., SAMBAR S.S., CONWAY J.
Amer. J. cardiol., 1970, 25, 642
- 48 - DOLEZEL J.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ., Basel, 1969, p.148
- 49 - AHRENS R.A., BROXTON H.H.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1970, 134, 1043
- 50 - MATTSON F.H., ERICKSON B.A., KLIGMAN A.M.
Amer. J. clin. Nutr., 1972, 25, 589

- 51 - ALTLAND P.D., HIGHMAN B., NELSON B.D., GARBUS J.
Life Sciences, 1966, 5, 375
- 52 - GARBUS J., HIGHMAN B., ALTLAND P.D.
Amer. J. Physiol., 1964, 207, 467
- 53 - ALTLAND P.D., HIGHMAN B., GARBUS J.
Aerospace Med., 1964, 35, 1034
- 54 - HARALAMBIE G.
Acta Biol. Med. germ., 1966, 17, 34
- 55 - HALLAUER W., STAIGER J., SCHIRMEISTER J.
Klin. Wschr., 1972, 50, 210
- 56 - KACHADORIAN W.A., JOHNSON R.E.
Amer. Heart J., 1971, 82, 278
- 57 - SCHMIDT H., GADERMANN E., VOIGT K.D.
Med. Welt, Stg. 1970, 21, 1675
- 58 - BASSISM.L., COLLEN M.F.
Automation in analytical chemistry
Technicon symposium, 1966
- 59 - GOLDBERG D.M., WINFIELD D.A.
8th intern. Congress on clinical chemistry, Copenhagen, 1972
- 60 - WERNER M., TOLLS R.E., HULTIN J.V., MELLECKER J.
Z. klin. Chem. klin. Biochem., 1970, 8, 105
- 61 - REED A.H., CANNON D.C., WINKELMAN J.W., BHASIN Y.P., HENRY R.J.,
PILEGGI V.J.
Clin. Chem., 1972, 18, 57
- 62 - KILBOM A.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 1971, 28, 345
- 63 - STEINHAUS A.H.
Physiol. Rev., 1933, 13, 103
- 64 - DIETER M.P.
Life Sciences, 1970, 9, 301
- 65 - HUNTER J.B., CRITZ J.B.
J. appl. Physiol., 1971, 31, 20
- 66 - KEUL J., HARALAMBIE G.
In : Das gesunde und kranke Herz bei körperlicher Belastung
Steinkopff, Darmstadt, 1971
- 67 - BEATON J.R., OYSTER B.
Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1969, 47, 396
- 68 - OSCAI L.B., MOLE P.A., HOLLOSZY J.O.
Amer. J. Physiol., 1971, 220, 1944

- 69 - KRAUS H., KINNE R.
Pflügers Arch. ges. Physiol., 1970, 321, 332
- 70 - HARALAMBIE G.
Clin. Chim. Acta, 1969, 26, 287
- 71 - HIGHMAN B., ALTLAND P.D.
Amer. J. Physiol., 1963, 205, 162
- 72 - CALVY G.L., CADY L.D., MUFSON M.A., NIERMAN J., GERTLER M.M.
J. amer. Med. Ass., 1963, 183, 1
- 73 - BARNARD R.J., TERJUNG R.L., TIPTON C.M.
Int. Z. angew. Physiol., 1968, 25, 303
- 74 - CARLSON L.A., MOSSFELDT F.
Acta physiol. scand., 1964, 62, 51
- 75 - CAMPBELL D.E.
J. lip. Research. , 1965, 6, 478
- 76 - DUPERRAY B., PACHECO M.
Therapie, 1968, 23, 1307
- 77 - KEPPLER D., KEUL J., DOLL E.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ., Basel, 1969, p.132
- 78 - DIAMANT B., KARLSSON K., SALTIN B.
Acta physiol. scand., 1968, 72, 383
- 79 - VANROUX R.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ., Basel, 1969, p.89
- 80 - KEUL J., DOLL E., KEPPLER D.
Pflügers Arch.ges. Physiol., 1968, 301, 198
- 81 - NAGLE F., ROBINHOLD D., HOWLEY E., DANIELS J., BAPTISTA G., STOEDEFALKE K.
Med. Sci. Sports, 1970, 2, 182
- 82 - SCHWARTZ P.L., DOUGLAS J.S., CARROLL H.W.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1971, 138, 130
- 83 - MOORE S., STEIN W.M.
J. biol. Chem., 1964, 211, 895
- 84 - POORTMANS J.R., SIEST G., GALTEAU M.M., HOUOT O.
Int. Z. angew. Physiol.
A parasite
- 85 - FELIG P., WAHREN J.
In : muscle metabolism during exercise
PERNOM B. and SALTIN B. Ed., Plenum Press Publ., N.Y. London, 1971, 11, 205
- 86 - HOLLMANN W., KASTNER K.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ. Basel, 1969, p.81

- 87 - HENNY J., HOUOT O., SCHIELE F., SIEST G.
Approche de la standardisation du prélèvement. Etude sur sérum et plasma
A paraître
- 88 - JEFFRESS R.N., PETER J.B., LAMB D.R.
Life Sciences, 1968, 7, 957
- 89 - PETER J.B., JEFFRESS R.N., LAMB D.R.
Science, 1968, 160, 200
- 90 - LAMB D.R., PETER J.B., JEFFRESS R.N., WALLACE H.A.
Amer. J. Physiol., 1969, 217, 1628
- 91 - BARNARD R.J., PETER J.B.
J. appl. Physiol., 1969, 27, 691
- 92 - BARNARD R.J., PETER J.B.
J. appl. Physiol., 1971, 31, 904
- 93 - ROUGIER G., BABIN R., BABIN J.P., FAUSSIER M.
Rev. Fr. Pharm., 1972, , 29
- 94 - KENDRICK-JONES J., PERRY S.V.
Nature, 1965, 208, 1068
- 95 - CORNELIUS C.E., BURNHAM L.G., HILL H.E.
J. amer. vet. med. Ass., 1963, 142, 639
- 96 - ALTLAND P.D., HIGHMAN B., NELSON B.D.
Amer. J. Physiol., 1968, 214, 28
- 97 - CRITZ J.B.
Proc. Soc. exp. Biol. N.Y., 1966, 121, 101
- 98 - ALTLAND P.D., HIGHMAN B.
Amer. J. Physiol., 1961, 201, 393
- 99 - SANGSTER J.F., BEATON J.R.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1966, 122, 542
- 100 - NOVOSADOVA J.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ., Basel, 1969, p.254
- 101 - BLOOR C.M., PAPADOPOULOS N.M.
J. appl. Physiol., 1969, 26, 371
- 102 - PAPADOPOULOS N.M., LEON A.S., BLOOR C.M.
Proc. Soc. exp. Biol. N.Y., 1968, 129, 232
- 103 - PAPADOPOULOS N.M., LEON A.S., BLOOR C.M.
Proc. Soc. exp. Biol. N.Y., 1967, 125, 999
- 104 - BEDRAK E.
J. appl. Physiol., 1965, 20, 587

- 105 - AHLBORG B., BROHULT J.
Acta med. scand., 1967, 182, 41
- 106 - BAUMANN P., ESCHER J., RICHTERICH R.
Schweiz. Z. Sportmed., 1962, 10, 33
- 107 - BLOCK P., VAN RIJMENANT M., BADJOU R., VAN MELSEM A.Y., VOGELEER R.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed. Karger Publ., Basel, 1969, p.259
- 108 - CRITZ J.B., MERRICK A.W.
Bull. Soc. exp. Biol. Med., 1962, 109, 608
- 109 - FOWLER W.M., GARDNER G.W., KAZERUNIAN H.H., LAUVSTAD W.A.
Arch. Phys. Med. Rehabil., 1968, 49, 554
- 110 - GARDNER G.W., BRATTON R., CHOWDHURY S.R., FOWLER W.M., PEARSON C.M.
J. Sports Med. Physical Fitness, 1964, 4, 103
- 111 - GRIFFITHS P.D.
Clin. chim. Acta, 1966, 13, 413
- 112 - HALONEN P.J., KONTTINEN A.
Nature, 1962, 10, 942
- 113 - KUSTNER W., PAETZEL A., WEINREICH J.
Med. Klin., 1966, 61, 1858
- 114 - McKECHNIE J.K., LEARY W.P., JOUBERT S.M.
J. Lab. Clin. Med., 1967, 48, 722
- 115 - OTTO P., SCHMIDT E., SCHMIDT F.W.
Klin. Wschr., 1964, 2, 75
- 116 - POORTMANS J.R., S'JONGERS J.J., THYS A., VAN KERCHOVE E.
Rev. Franç. Et. clin. biol., 1963, 8, 173
- 117 - REMMERS A.R., KALJOT M.V.
J. amer. med. Ass., 1963, 185, 968
- 118 - ROSE L.T., BOUSSER J.E., COOPER K.H.
J. appl. Physiol., 1970, 29, 355
- 119 - ROSE L.T., LOWE S.L., CARROLL D.R., WOLFSON S., COOPER K.H.
J. appl. Physiol., 1970, 28, 279
- 120 - SCHLANG H.A., KIRKPATRICK C.A.
Amer. J. med. Sci., 1961, 242, 338
- 121 - SCHWARTZ P.L., CARROLL M.W., DOUGLAS J.S.
Int. Z. angew. Physiol., 1971, 30, 20
- 122 - SWAIMAN K.F., AWAD E.A.
Neurology, Minneap., 1964, 14, 977
- 123 - TOPI G.C., GANDOLFO D'ALESSANDRO L., PIOVANO G.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ., Basel, 1969, p.280

- 124 - VEJAJIVA A., TEASDALE G.M.
Brit. Med. J., 1965, 1, 1653
- 125 - FOWLER W.M., CHOWDHURY S.R., PEARSON C.M., GARDNER G., BRATTON R.
J. appl. Physiol., 1962, 17, 943
- 126 - BRATTON R.D., CHOWDHURY S.R., FOWLER W.R., GARDNER G.W., PEARSON C.M.
Research Quaterly, 1962, 33, 182
- 127 - HARALAMBIE G., KEUL J.
Med. Sci. Sports, 1971, 3, 79
- 128 - AHLBORG B., BROHULT J.
Lancet, 1966, 4, 1272
- 129 - MORGENSTERN S., KESSLER G., AUERBACH J., FLOR R.V., KLEIN B.
Clin. Chem., 1965, 11, 876
- 130 - MORGENSTERN S., OKLANDER M., AUERBACH J., KAUFMAN J., KLEIN B.
Clin. Chem., 1966, 12, 95
- 131 - BECHTLER G.
In : Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie Publ., Weinheim/Bergstr., 1970 P. 1067
- 132 - SIEST G., BAGREL A., PANEK E., GALTEAU M.M., BATT A.M., SCHIELE F.
In : Reference values in human chemistry
SIEST G. Ed., Karger Publ., Basel, 1973 p.28
- 133 - BÖTTIGER L.E.
Acta med. scand., 1971, 190, 359
- 134 - CUNNINGHAM D.A., MONTROYE H.J., METZNER H.L., KELLER J.B.
Med. Sci. Sports, 1969, 1, 165
- 135 - BUCHER Th., KLINGENBERG M.
Angew. Chem., 1958, 70, 552
- 136 - VESELL E.S., POOL P.E.
Proc. nat. Acad. Sci. Wash., 1966, 55, 756
- 137 - KLUGE A., HAUG H.
Blut, 1970, 21, 20
- 138 - CARLSSON E.I., KARLSSON B.W.
Life Sciences, 1969, 8, 235
- 139 - CALS M.J., BAILLY M.
In : Reference values in human chemistry
SIEST G. Ed., Karger Publ., Basel, 1973 p.290
- 140 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W., HERFARTH C.
Enzym. biol. clin., 1966, 7, 53
- 141 - SCHEVING L.E., PAULY J.E., TIEN-HU TSAI
Amer. J. Physiol., 1968, 215, 1096

- 142 - GERLACH U., LOSSE H., SCHMIDT C.G.
Klin. Wschr., 1961, 39, 195
- 143 - HIGHMAN B., ALTLAND P.D., GARBUS J.
Arch. Path., 1965, 80, 332
- 144 - ENGLHARDT A.
Med. Klin., 1966, 61, 1409
- 145 - SCHRAMM M.
Annu.Rev.Biochem., 1967, 36, 307
- 146 - COX C.G., RAFFER G.W.
Biochem. med., 1971, 5, 227
- 147 - DUBACH U.C.
Helv. med. Acta, 1966, 33, 139
- 148 - KUBISZ P., CAEN J.P.
Rev. eur. Et. clin. biol., 1970, 15, 123
- 149 - FRIEDEL R., TRAUTSCHOLD I.
Z. klin. Chem. klin. Biochem., 1971, 9, 10
- 150 - FRIEDEL R., MATTENHEIMER H.
Z. anal. chemie, 1970, 252, 204
- 151 - SCHMIDT E.
In : Praktische Enzymologie
SCHMIDT F.W. Ed., Verlag Huber Haus Publ., Stuttgart, 1968, p.98
- 152 - CERRETELLI P., CANTONE A., MORANDINI M.L., MAMMANO R.
Boll. Soc.ital. Biol. sper., 1959, 35, 1935
- 153 - SMITH R.E., HOLJER D.J.
Physiol. Rev., 1962, 42, 60
- 154 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ., Basel, 1969, p.216
- 155 - BENHAMOU J.P., SICOT C., ERLINGER S.
Presse Med., 1971, 79, 185
- 156 - WADE O.L., COMBES B., CHILDS A.W., WHEELER M.O., CURNAND A., BRADLEY S.E.
Clin. Sci., 1956, 15, 457
- 157 - ROWELL L.B.
In : Muscle metabolism during exercise
PERNOW B. and SALTIN B. Ed., Plenum Press Publ., N.Y. London, 1971, 11, p.127
- 158 - RAAB W.
Z.klin. Chem. klin. Biochem., 1971, 9, 143
- 159 - LABAT J., BARK C., COURTOIS J.E., DEMELLIER J.F.
Ann. Biol. Clin., 1972, 30, 253

- 160 - LATNER A.L.
In : Isoenzymes in biology and medicine
LATNER A.L., SKILLEN A.W. Ed., Acad. Press Publ., London 1968, p.80
- 161 - GALE J.B., NAGLE J.
Nature, 1971, 232, 342
- 162 - CANONICO P.G., BIRD M.
J. Cell. Biol., 1970, 45, 321
- 163 - HOLLOSZY J.O., OSCAI L.B., DON I.J., MOLE P.A.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, 40, 1368
- 164 - MOLE P.A., HOLLOSZY J.O.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1970, 134, 789
- 165 - HOLLOSZY J.O.
J. biol. Chem., 1967, 242, 2278
- 166 - THARP G.D.
Int. Z. angew. Physiol., 1971, 29, 195
- 167 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W., HERFARTH C., DETTMAR K.H., FABEL H.
Enzym. biol. clin., 1966, 7, 167
- 168 - ELGER J., VOLKMANN H.J., WAHRENBERG I., KLINGER W.
Arch. Toxikol., 1970, 27, 40
- 169 - SIBLEY J.A.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1958, 75, 339
- 170 - McLEAN A.E.M.
Biochem. J., 1963, 89, 54
- 171 - REINDORP S., WHITEHEAD R.G.
Brit. J. Nutr., 1971, 25, 273
- 172 - CREWS E.L., FUGE W., OSCAI L.B., HOLLOSZY J.O., SHANK R.E.
Amer. J. Physiol., 1969, 216, 359
- 173 - GRANGAUD R., NICOL M., SAVOURE N.
Sem. Hôp. Paris, 1971, 47, 1089
- 174 - BAILEY D.A., CARRON A.V., TEECE R.G., WEHNER H.
Int. Z. Vitaminforsch., 1970, 40, 435
- 175 - BRUN P.
Bull. Soc. sc. Hyg. Alim., 1963, 51, 97
- 176 - SHARMAN I.M., DOWN M.G., SEN R.N.
Brit. J. Nutr., 1971, 26, 265
- 177 - HEROUX O.
Canad. J. Biochem. Physiol., 1958, 36, 289
- 178 - DIETER M.P., ALTLAND P.D., HIGHMAN B.
Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1969, 47, 1025

- 179 - DIETER M.P., ALTLAND P.D., HIGHMAN B.
Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1970, 48, 723
- 180 - PETAJAN J.H., VOGWILL M.T., MURRAY M.B.
J. appl. Physiol., 1969, 27, 528
- 181 - BINGHAM W.G., PAUL S.E., SURYANARAYAMA SASTRY K.S.
Arch. Neurol. Chicago, 1969, 21, 649
- 182 - CUTINELLI L., SORRENTINO L., TRAMONTI C., SALVATORE F., CEDRANGOLO F.
Arzneimittelforsch., 1970, 20, 1064
- 183 - MELTZER H.
Biochem. Pharmacol., 1971, 20, 1739
- 184 - SENAY L.C.
J. Physiol. Lond., 1972, 224, 61
- 185 - BUSKIRK E.R., HARRIS D., MENDEZ J., SKINNER J.
Amer. J. clin. Nutr., 1971, 24, 1119
- 186 - PLOMTEUX G., BEAUMARIAGE M.L., BACQ Z.M., HEUSGHEM C.
Biochem. Pharmacol., 1970, 19, 2799
- 187 - WAGNER J.A., CRITZ J.B.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1968, 128, 716
- 188 - LEIRIS DE J., BRETON D., FEUVRAY D., CORABOEUF E.
Arch. Int. Physiol. Biochim., 1969, 77, 749
- 189 - HAUSS W.H., GERLACH U., SHUMEYER E.
Dtsch. med. Wschr., 1958, 83, 1310
- 190 - KLEINE T.O.
Z. klin. Chem. klin. Biochem., 1971, 9, 10
- 191 - WRIGHT N., CLARKSON A.R., BROWN S.S., FURSTER V.
Brit. med. J., 1971, 3, 347
- 192 - BOUNOUS C., McARDLE H.A.
J. surg. Res., 1969, 9, 339
- 193 - FELL H.B.
Vitamins hormones, N.Y., 1964, 22, 81
- 194 - LOEGERING D.J., CRITZ J.B.
Amer. J. Physiol., 1971, 220, 100
- 195 - FISCHER A., TAKACS L.
In : Quantitative biology of metabolism
LOCKER A. Ed., Springer Verlag Publ., 1968, p.182
- 196 - RUFF F., SAINDELLE A., DUTRIPON E., PARROT J.L.
In : Automatisations in analytical chemistry
Technicon symposium, 1967, 2, 216

- 197 - FORICHON J., MINAIRE Y., STUDIEVIC C.
Path. Biol., 1967, 15, 40
- 198 - GODSE D.D., LYALL W.A.L., STANCER M.C.
Clin. chim. Acta, 1969, 26, 89
- 199 - KRUSE-JARRES J.D., WEINEL B., KLINGMULLER V.
In : Organisation des laboratoires - Biologie prospective
SIEST G. Ed., Exp. Sc. Franç. Publ., Paris, 1973
- 200 - BROWN M.E., BLANEY B., LABUCKAS A.
In : Automatisation in analytical chemistry
Technicon symposium, 1967, 1, 35
- 201 - GROFF W.A., MOUNTER L.A., SIM V.M.
In : Automatisation in analytical chemistry
Technicon symposium, 1966, p.498
- 202 - LEIRIS DE J., BRETON D., CORABOEUF E.
In : Automatisation in analytical chemistry
Technicon symposium, 1966, 2, 303
- 203 - GUISARD D., GONAND J.P., DEBRY G.
Clin. chim. Acta, 1971, 35, 493
- 204 - FREUND H.
Ann. Biol. Clin., 1967, 25, 421
- 205 - FREUND H.
Thèse, Faculté de Pharmacie, Strasbourg, 1970
- 206 - DUCHENE-MARULLAZ P., VACHER J., TALVARD J.
C.R.Soc.Biol., 1964, 158, 1510
- 207 - DUCHENE-MARULLAZ P., COSNIER D., TALVARD J.
C.R.Soc. Biol., 1966, 160, 2312
- 208 - DUCHENE-MARULLAZ P. , TALVARD J.
In : Automatisation in analytical chemistry
Technicon symposium, 1966, 2, 265
- 209 - ROOS F., VIGNERON C., RIES-BOURGAUX M., STUDIEVIC C., SIEST G.
Ann. Biol. Clin., 1969, 27, 201
- 210 - ROOS F.
Thèse, Faculté de Pharmacie, Nancy, 1969
- 211 - SIEST G., GALTEAU M.M.
In : Reference values in human chemistry
SIEST G. Ed., Karger Publ., Basel, 1973 p.221
- 212 - SOLVONUK P.F., McRAE S.C., COLLIER H.B.
Canad. J. Biochem. Physiol., 1956, 34, 481
- 213 - STEIN P., LAMPRECH T.
In 210 : ROOS F, Thèse, Faculté de Pharmacie, Nancy, 1969

- 214 - GRIFFITHS W.J., FITZPATRICK M.
Brit. J. Haemat., 1967, 13, 175
- 215 - EATON J.W., FAULKNER J.A., BREWER G.J.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1969, 132, 886
- 216 - COSTILL D.L., BOWERS R., BRANAM G., SPARKS K.
J. appl. Physiol., 1971, 31, 834
- 217 - SALTIN B., KARLSSON J.
In : Muscle metabolism during exercise
PERNOW B. and SALTIN B. Ed., Plenum Press Publ., N.Y.London, 1971, 11, p.289
- 218 - NUTTALL F.Q., JONES B.
J. Lab. clin. Med., 1968, 71, 847
- 219 - HARALAMBIE G.
In : Reference values in human chemistry
SIEST G. Ed., Karger Publ., Basel, 1973, p.241
- 220 - STACHE S., FRIMMER M.
Int. Z. Vitaminforsch., 1970, 40, 145
- 221 - LANGSLET A.
Europ. J. Pharmacol., 1971, 13, 292
- 222 - FEUVRAY D., LEIRIS DE J.
Europ. J. Pharmacol., 1971, 16, 8
- 223 - WOLLENBERGER A., ONNEN K., HINTERBERGER U., RABITZSCH G., KLEITKE B.
Cardiology, 1971-1972, 56, 48
- 224 - BERCOT M., MENDONCA DE M., SCHWARTZ K., LEANDRI J., CACHERA J.P.
Cryobiology, 1972, 9, 479
- 225 - LEIRIS DE J., FEUVRAY D.
Cardiovascular Research, 1973, 7, 383
- 226 - ZIERLER K.L.
Amer. J. Physiol., 1955, 183, 675
- 227 - ZIERLER K.L.
Amer. J. Physiol., 1956, 185, 1
- 228 - ZIERLER K.L.
Amer. N.Y. Acad. Sci., 1958, 75, 227
- 229 - ZIERLER K.L.
Bull. Johns Hopk.Hosp., 1958, 102, 17
- 230 - ZIERLER K.L.
Amer. J. Physiol., 1958, 193, 534
- 231 - ZIERLER K.L.
Amer. J. Physiol., 1958, 192, 283
- 232 - ZIERLER K.L.
Amer. J. Physiol., 1957, 190, 201

- 233 - DAWSON D.M.
Biochim. Biophys. Acta, 1966, 113, 144
- 234 - DANDRIFOSSE G., SCHOFFENIELS E.
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 94, 165
- 235 - ARGENT B.E., CASE R.M., SCRATCHERD T.
J. Physiol., 1973, 230, 575
- 236 - McARDLE B., THOMPSON R.H.S., WEBSTER G.R.
J. Neurochem., 1960, 5, 135
- 237 - GOLLNICK P.D., ARMSTRONG R.B., SAUBERT C.W., PIEHL K., SALTIN B.
J. appl. Physiol., 1972, 33, 312
- 238 - GURPIDE E., STOLEE A., TSENG L.
In : In vitro methods in reproductive cell biology
Karolinska Symposia III, 1971, p.247
- 239 - DUJOVNE C.A., LEVY R., ZIMMERMAN H.J.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1968, 128, 561
- 240 - KARLSSON B.W., CARLSSON E.T.
Life Sciences, 1970, 9, 291
- 241 - SEEMAN P.
In : Permeability and function of biological membranes
BOLIS L. Ed., North Holland Publ., Amsterdam, 1970, p.40
- 242 - DANIEL A.M., BLEVINGS S., BEAUDOIN J.G., McLEAN L.D.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1972, 139, 894
- 243 - WEISSMANN G., ZURIER R.B., SPIELER P.J., GOLDSTEIN I.M.
J. exp. Med., 1971, 134, 149
- 244 - HAGEN I.
Biochim. Biophys. Acta, 1972, 273, 141
- 245 - FRIEDEL R., MATTENHEIMER H.
Z. klin. Chem. klin. Biochem., 1971, 9, 103
- 246 - CULP L.A., BLACK P.H.
Biochemistry, 1972, 11, 2161
- 247 - BROWN K.I., CRABO B.G., GRAHAM E.F., PACE M.M.
Cryobiology, 1971, 8, 220
- 248 - FISHBEIN W.N.
Cryobiology, 1971, 8, 293
- 249 - ESTRADA-O S., MONTAL M., CELIS H., CARABEZ A.
Eur. J. Biochem., 1970, 12, 227
- 250 - CLENDENON N.R., KOMATSU T., ALLEN N., GORDON W.A.
Neurology, 1971, 21, 103
- 251 - ROSENTHAL S., RAPOPORT S.
Acta biol.med.germ., 1961, 6, 7

- 252 - HAWIGER J., HORN R.G., KOENIG M.G., COLLINS R.D.
Yale J. Biol. Med., 1969, 42, 57
- 253 - BINGHAM W.G., PAUL S.E., SURYANARAYANA SASTRY K.S.
Neurology, 1971, 21, 111
- 254 - PERSIDSKY M.D., ELLETT M.H.
Cryobiology, 1971, 8, 345
- 255 - MALBICA J.O.
Proc. Soc. exp. Med., 1971, 137, 1140
- 256 - GRANT N.H., ROSENTHALE M.E., ALBURN M.H., SINGER A.C.
Biochem. Pharmacol., 1971, 20, 2821
- 257 - VAN CANEGHEM P.
Biochem. Pharmacol., 1972, 21, 1543
- 258 - MALBICA J.O., HART L.G.
Biochem. Pharmacol., 1971, 20, 2017
- 259 - SZEGO C.M., SEELER B.J., STEADMAN R.A., HILL D. KIMURA A.K., ROBERTS J.A.
Biochem. J., 1971, 123, 523
- 260 - TRIGAUX J.P., RONVEAUX DUPAL M.F., WATTIAUX R.
Biochem. Pharmacol., 1972, 21, 429
- 261 - SELYE H.
In : Hormones and resistance
SELYE H. Ed., Springer Verlag Publ., Berlin, 1971, 2, 753
- 262 - GOUBERN M., N'DIAYE-BUISSON F., FERRANDO R., TERROINE T.
Arch. Sci. Physiol., 1971, 25, 545
- 263 - HIGASHINO K., TAKAHASKI Y., YAMAMURA Y.
Clin. chim. Acta, 1972, 41, 313
- 264 - VAINIO H.
Biochim. Biophys. Acta, 1973, 307, 152
- 265 - EDWARDS B.A., EDWARDS M.E., THORN N.A.
Acta endocrin., 1973, 72, 417
- 266 - GRUNDMANN R., PICHLAMAIER M.
Res. exp. Med., 1973, 159, 298
- 267 - OHISHI I., SHIOYA A.
Jap. J. Pharmacol., 1970, 20, 44
- 268 - FLEISHER G.A., WAKIM K.G.
Proc. Staff meetings Mayo Clinic, 1956, 31, 640
- 269 - LAUDAHN G.
Z. ges. exp. Med., 1959, 132, 346
- 270 - BRUNS F.J., BROSSWITZ E., DENNEMANN H., HORN H.D., NOLTMANN E.
Klin. Wschr., 1961, 39, 342

- 271 - SERBAN M., SERBAN M.
Rev. Roum. Biochim., 1971, 8, 159
- 272 - WOODIN A.M., WIENEKE A.A.
Biochem. J., 1966, 99, 469
- 273 - CLARKE F.M., MASTERS C.J., WINZOR D.J.
Biochem. J., 1970, 118, 325
- 274 - RAAB W.P.
Arzneim. Forsch., 1970, 20, 1620
- 275 - GALTEAU M.M., SIEST G.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 1972, 29, suppl.126
- 276 - SIEST G., GALTEAU M.M.
Enzyme
A paraître
- 277 - SIEST G., GALTEAU M.M.
In : Reference values in human chemistry
SIEST G. Ed., Karger Publ., Basel, 1973, P.221
- 278 - HEARN G.R., WAINIO W.W.
Amer. J. Physiol., 1957, 190, 206
- 279 - GOULD M.K., RAWLINSON W.A.
Biochem. J., 1959, 73, 41
- 280 - HEARN G.R.
Amer. J. Physiol., 1959, 196, 465
- 281 - RAWLINSON W.A., GOULD M.K.
Biochem. J., 1959, 73, 44
- 282 - GOLLNICK P.D., STRUCK P.J., BOGYO T.P.
J. appl. Physiol., 1967, 22, 623
- 283 - PETTE D.
In : Praktische Enzymologie
SCHMIDT F.W. Ed., Verlag Hans Huber Publ., Bern, Stuttgart, 1968, p.15
- 284 - BERGMAYER H.U., BERNT E.
In : Methoden der enzymatischen analyse
BERGMAYER H.U. Ed., Verlag Chemie Publ., Weinheim, 1970, 1, 1065
- 285 - ERMINI M.
Gerontologia, 1970, 16, 231
- 286 - SERBAN M., SERBAN M.
Rev. roum. Biochim., 1970, 7, 231
- 287 - DHALLA N.S., FEDELESOVA M., TOFFLER I.
Canad. J. Biochem., 1971, 49, 1202
- 288 - DOTY D.M., BLOOR C.M., SOBEL B.E.
J. appl. Physiol., 1971, 30, 548

- 289 - HOLLOSZY J.O., OSCAI L.B., MOLE P.A., DON I.J.
In : Muscle metabolism during exercise
PERNOW B. and SALTIN B. Ed., Plenum Press Publ., N.Y.London, 1971, 11, 51
- 290 - OSCAI L.B., HOLLOSZY J.O.
J. biol. Chem., 1971, 246, 6968
- 291 - SERBAN M.
Rev. roum. Biochim., 1971, 8, 271
- 292 - CRABTREE B., NEWSHOLME E.A.
Biochem. J., 1972, 126, 49
- 293 - ERMINI M., SZELENYI I.
Experiantia, 1972, 28, 403
- 294 - KNOX W.E.
In : Enzyme patterns in fetal, adult and neoplastic rat tissues
Karger Ed., Basel, 1972, p.258
- 295 - OREVI M., GORIN E., SHAFRIR E.
Europ. J. Biochem., 1972, 30, 418
- 296 - MASTERS C.J.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 167, 161
- 297 - TAUCHI H., YOSHIOKA T., KOBAYASHI H.
Gerontologia, 1971, 17, 219
- 298 - HOWARTH R.E., BALDWIN R.L.
J. Nutr., 1971, 101, 485
- 299 - FUGE K.W., CREWS E.L., PATTENGAL P.K., HOLLOSZY J.O., SHANK E.D.
Amer. J. Physiol., 1968, 215, 660
- 300 - TERROINE Th., HITIER Y.
Ann. Nutr. Alim., 1969, 23, 199
- 301 - HEROUX O., SAINT PIERRE J.
Amer. J. Physiol., 1957, 188, 163
- 302 - SCARIA K.S., JOSEPH N.T., PREMALATHA L.S., PREMA K.
Indian J. exp. Biol., 1965, 3, 112
- 303 - SIMON R.G., EYBEL C.E., GALSTER W., MORRISON P.
Comp. Biochem. Physiol., 1971, 40B, 601
- 304 - DEPOCAS F.
Brit.med. Bull., 1961, 17, 25
- 305 - GOLLNICK P.D., KING D.W.
Amer. J. Physiol., 1969, 216, 1502
- 306 - TERJUNG R.L., BALDWIN K.M., MOLE P.A., KLINKERFUSS G.H., HOLLOSZY J.O.
Amer. J. Physiol., 1972, 233, 549

- 307 - TERJUNG R.L., KLINKERFUSS G.H., BALDWIN K.M., WINDER W.W., HOLLOSZY J.O.
Biochemical and electron microscopic evidence that exhausting exercise
does not cause disruption or hypertrophy of heart mitochondria in rats.
A paraître.
- 308 - BOZNER A., MEESSEN H.
Virchows. Arch. Abt. B. Zellpath., 1969, 3, 248
- 309 - POORTMANS J.R.
Kinanthropologie, 1972, 4/1, 3
- 310 - BALDWIN K.M., KLINKERFUSS G.H., TERJUNG R.L., MOLE P.A., HOLLOSZY J.O.
Amer. J. Physiol., 1972, 222, 373
- 311 - YAKOVLEV N.N.
In : Biochemistry of exercise
POORTMANS J.R. Ed., Karger Publ., Basel, 1969
- 312 - MORGAN E.T., COBB L.A., SHORT F.A., ROSS R., GUNN D.R.
In : Muscle metabolism during exercise
PERNOW B. and SALTIN B. Ed., Plenum Press Publ., N.Y. London, 1971, 11, 69
- 313 - SHORT F.A., COBB L.A., KAWABORI I., GOODNER C.J.
Amer. J. Physiol., 1969, 217, 327
- 314 - HULTMAN E., BERGSTROM J., ROCH-NORLUND A.E.
In : Muscle metabolism during exercise
PERNOW B. and SALTIN B. Ed., Plenum Press Publ., N.Y. London, 1971, 11, 273
- 315 - KOWALSKI K., GORDON E.E., MARTINEZ A., ADAMEK J.
J. Histochem. Cytochem., 1969, 17, 601
- 316 - GOLLNICK P.D., HEARN G.R.
Amer. J. Physiol., 1961, 201, 694
- 317 - BJÖRNTORP P., FAHLEN M., HOLM J., SCHERSTEN T., SZOSTAK V.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 1970, 26, 145
- 318 - MOLE P.A., OSCAI L.B., HOLLOSZY J.O.
J. Clin. Invest., 1971, 50, 2323
- 319 - HEARN G.R., WAINIO W.W.
Amer. J. Physiol., 1956, 185, 348
- 320 - BEDI G.S., BHANDARI P.K., NATH N.
Indian J. Exp. Biol., 1971, 9, 326
- 321 - OSCAI L.B., MOLE P.A., BREI B., HOLLOSZY J.O.
Amer. J. Physiol., 1971, 220, 1238
- 322 - VERGNES H., MORET P., DUCHOSAL F.
In : Pré-adaptation et adaptation génétique
Publication INSERM, 1972

- 323 - FALHOLT K., DOHN K., FALHOLT W.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 1972, 29, 5
- 324 - KIM M.S., HAN S.S.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1969, 130, 1042
- 325 - KNOX W.E., GREENGARD O.
In : Advances in enzyme regulation
WEBER C. Ed., Pergamon Press Publ., London, 1964
- 326 - AQUARON R., SERRATRICE G.
C.R.Soc. Biol., 1972, 166, 653
- 327 - OPIE L.H., NEWSHOLME E.A.
Biochem. J., 1967, 103, 391
- 328 - BASS A., GUTMANN E., HANZLIKOVÁ V., SYROVÝ I.
Physiol. Bohemoslav., 1971, 20, 423
- 329 - NOLTE J., PETTE D.
J. Histochem. Cytochem., 1972, 20, 577
- 330 - PANEK E., CASTRO E., LANDRY Y., SIEST G.
Bull. Soc. Pharm. Nancy, 1971, 88, 25
- 331 - BINETTE Y., MAK E.
Bull. Corp. Biochem. Hop. Quebec, 1969, 8, 51
- 332 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.
J. biol. Chem., 1951, 193, 265
- 333 - ASSOUS E., DREUX C., GIRARD L.
Ann. Biol. Clin., 1960, 5, 319
- 334 - PENHOET E., RAJKUMAR T., RUTTER W.J.
Proc. Nat. Acad. Sci., 1966, 56, 1275
- 335 - RENSING U., SCHMID A., CHRISTEN P., LEUTHARDT F.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1967, 348, 1001
- 336 - PENHOET E.E., KOCHMAN M., RUTTER W.J.
Biochemistry, 1969, 8, 4391
- 337 - COTARIU D., SERBAN M.
Rev. roum. Biochim., 1969, 6, 11
- 338 - DE LUCA H.F., COHEN P.P.
In : Manometric techniques
UMBREIT W.W., BURRIS R.H., STAUFFER J.F. Ed., Burgess Publ., Minneapolis,
1964, p.132
- 339 - OPPER A.W., HUX C., MILLER J.M.
Exp. Med. Surg., 1971, 29, 19
- 340 - KÖRMENDY L., GANTNER G., HAMM R.
Z. Naturwissenschaften, 1965, 9, 209

- 341 - HEINZ F.
In : Praktische Enzymologie
SCHMIDT F.W. Ed., Verlag Hans Huber Publ., Bern, Stuttgart, 1968, I, 53
- 342 - WIELAND T., PFLEIDERER G., HAUPT I., WÖRNER W.
In : Isoenzymes
WILKINSON J.M., Ed., Chapman and Hall Publ., London, 1970
- 343 - THORLING E.B., JENSEN K.
Acta path. microbiol. scand., 1966, 66, 426
- 344 - PROCHAZKA B., QURESHI M.A., MATTY A.J.
Diabetologia, 1970, 6, 493
- 345 - SIEST G., GALTEAU M.M.
Variations des enzymes musculaires chez le rat sous l'influence de
régimes protéiques différents.
Travaux en cours
- 346 - TONNELAT J.
Biophysique
Masson Ed., 1968
- 347 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W.
Enzymol. biol. clin., 1962/63, 2, 223
- 348 - DOERY J.C., HIRSH J., DE GRUCHY G.C.
Brit. J. Haem., 1970, 19, 145
- 349 - MORTON R.K.
In : Methode in enzymology
Acad. Press Ed., London, 1965
- 350 - WAINIO W.W.
The mammalian mitochondrial respiratory chain
Acad. Press Ed., London, 1970
- 351 - ROODYN D.B.
In : Enzyme cytology
ROODYN DB Ed., Acad. Press London Publ., 1967, p.103
- 352 - MAMELI L., GIANETTO R.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1973, 50, 316
- 353 - LENAZ G.
Ann. N.Y.Acad.Sci., 1972, 20, 39
- 354 - ROELOFSEN B., ZWAAL R.F.A., VAN DEENEN L.L.M.
In : Membrane bound enzymes
PORCELLATI G. and DI JERO F. Ed., Plenum Press Publ., N.Y.London,
1971, p.209
- 355 - REID E.
In : Enzyme cytology
ROODYN D.B. Ed., Acad. Press Publ., London N.Y., 1967, p.321

- 356 - DODD G.H.
Eur. J. Biochem., 1973, 33, 418
- 357 - BERGER M., LAHNECHE B.
Biophysique médicale
BAILLIERE et fils Ed., Paris, 1969
- 358 - FINEAN J.B., COLEMAN R.
In : Membranes, Structure and Function
VILLANUEVA J.R. and PONZ F. Ed., Acad. Press Publ., London N.Y., 1970, p9
- 359 - JAMES K.A.C., TATE W.P., TRUSCOE R.
Enzymologia, 1969, 37, 131
- 360 - ARNOLD H., HENNING R., PETTE D.
Eur. J. Biochem., 1971, 22, 121
- 361 - CLARKE F.M., MASTERS C.J.
Arch. Biochem. Biophys., 1972, 153, 258
- 362 - CLARKE F.M., MASTERS C.J.
Arch. Biochem. Biophys., 1973, 156, 673
- 363 - PANEK E.
Thèse, Faculté de Pharmacie, Nancy, 1973
- 364 - COTMAN C.W., LEVY W., BANKER G., TAYLOR D.
Biochim. Biophys. Acta, 1971, 249, 406
- 365 - ARNOLD H., PETTE D.
Eur. J. Biochem., 1970, 15, 360
- 366 - ARNOLD H., PETTE D.
Eur. J. Biochem., 1968, 6, 163
- 367 - GIBBONS J., PERHAM R.N.
Biochem. J., 1970, 117, 415
- 368 - MATTISSON A.G.M., JOHANSSON R.G., BOSTRÖM S.L.
Comp. Biochem. Physiol., 1972, 41, 475
- 369 - VESELL E.S., FRITZ P.J.
In : Enzymes synthesis and degradation in mammalian systems
RECHCIGL M.Ed., Karger Publ., Basel, 1971, p.339
- 370 - KRAMAR R.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1971, 352, 1267
- 371 - WILLIAMS R.J.P.
La Recherche, 1973, 4, 529
- 372 - GREEN D.E.
Ann. N.Y.Acad. Sci., 1972, 20, 150
- 373 - LERNER S.S., TAYLOR J.E., SHIRACHI D.Y.
Proc. West. Pharmacol. Soc., 1972, 15, 152

- 374 - RUSSELL W.E.
Eur. J. Biochem., 1973, 33, 459
- 375 - REYNOLDS J.A.
Ann. N.Y.Acad. Sci., 1972, 20, 75
- 376 - MUNOZ E., SALTON M.R.J., ELLAR D.J.
In : Membranes - Structure and function
VILLANUEVA J.R. and PONZ F. Ed., Acad. Press Publ., London N.Y., 1970, P51
- 377 - HATEFI Y., HANSTEIN W.G.
Arch. Bioch. Biophys., 1970, 138, 73
- 378 - HANSTEIN W.G., HATEFI Y.
Arch. Biochem. Biophys., 1970, 138, 87
- 379 - McFARLAND B.M., INESI G.
Arch. Biochem. Biophys., 1971, 145, 456
- 380 - SOTTOCASA G.L.
In : Membrane bound enzymes
PORCELLATI G. and DI JERO F. Ed., Plenum Press N.Y. London Publ.,
1971, p.229
- 381 - DULANEY J.T., TOUSTER O.
Biochim. Biophys. Acta, 1970, 196, 29
- 382 - WRIGHT D.L., PLUMMER D.T.
Biochim. Biophys. Acta, 1972, 261, 398
- 383 - PHILIPPOT J.
Biochim. Biophys. Acta, 1971, 225, 201
- 384 - MUSTAFA S.J., RUBIO R., BERNE R.M.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1972, 141, 161
- 385 - PAUL J.
Cell and tissue culture
LIVINGSTONE E. and S. Publ., Edinburgh and London, 1970
- 386 - MOSCONA A., TROWELL O.A., WILLMER E.N.
In : Cells and tissues in culture
WILLMER Ed., Acad. Press Publ., N.Y. London, 1965, 1, 19
- 387 - RINALDINI L.M.J.
Int. Rev. Cytol., 1958, 7, 587
- 388 - BODIAN D.
Virology, 1956, 4, 575
- 389 - YOUNGNER J.S.
Proc. Soc. exp. Biol. N.Y., 1954, 85, 202

- 390 - GROSS W.O., SCHÖPF-EBNER E., BUCHER O.M.
Exp. Cell. Res., 1968, 53, 1
- 391 - HOSICK H.L., STROHMAN R.C.
J. Cell. Physiol., 1971, 77, 145
- 392 - RODBELL M.
J. biol. Chem., 1964, 239, 375
- 393 - HINZ R.W., SYVERTON J.T.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1959, 101, 19
- 394 - HOWARD R.B., PESCH L.A.
J. biol. Chem., 1968, 243, 3105
- 395 - HAUNG Y.L., EBNER K.E.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 191, 161
- 396 - COON H.G.
Microbiology, 1966, 55, 66
- 397 - KALDOR J., SCHIAVONE D.J.
Clin. Chem., 1968, 14, 735
- 398 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W., HERFARTH C., OPITZ K., VOGELL W.
Enzym. Biol. Clin., 1966, 7, 185
- 399 - KRÖNER H.
Dtsch med. Wschr., 1971, 96, 551
- 400 - HOUPERT Y., LAHRICHI H., SAVIGNY P., SIEST G.
Libération de protéines à partir de leucocytes humains : influence
du milieu et du temps d'incubation
A paraître
- 401 - FÄSSLER B., VORBURGER C.
Schweiz. med. Wschr., 1973, 103, 311
- 402 - VORBURGER C., FÄSSLER B., KÖHL P.
Schweiz. med. Wschr., 1973, 103, 927
- 403 - GOSLING R., KERRY R.J., ORME J.E., OWEN G.
Brit. J. Psychiat., 1972, 121, 351

- AHLBORG B. (105) (128)
AHRENS R. A. (49)
ALBANESE A. A. (25)
ALTLAND P. D. (51) (53) (96) (98)
AQUARON R. (326)
ARGENT B. E. (236)
ARNOLD H. (360) (365) (366)
ASSOUS E. (333)
BAILEY D. A. (174)
BALDWIN K. M. (310)
BARNARD R. J. (73) (91) (92)
BASS A. (328)
BASSIS M. L. (58)
BAUMANN P. (106)
BEATON J. R. (67)
BEAUMONT W. van (23)
BECHTLER G. (131)
BEDI G. S. (320)
BEDRAK E. (104)
BENHAMOU J.P. (155)
BERCOT M. (224)
BERGER M. (357)
BERGMEYER H. U. (284)
BINETTE Y. (331)
BINGHAM W. G. (181) (253)
BITTNER D. (9)
BJORNTORP P. (317)
BLOCK P. (107)
BLOOR, C. M. (101)
BODIAN D. (388)
BOTTGER I. (44)
BOTTIGER L. E. (133)
BOUNOUS C. (192)
BOZNER A. (308)
BRATTON R. D. (126)
BROWN M. E. (200)
BROWN K. I. (247)
BRUN P. (175)
BRUNS F. J. (270)
BUCHER Th. (135)
BUSKIRK E. R. (185)
CALS M. J. (139)
CALVY G. L. (72)
CANONICO P. G. (162)
CANTONE A. (24)
CAMPBELL D. E. (75)
CARLSON L. A. (39) (74)
CARLSSON E. I. (138)
CERRETELLI P. (152)
CHASSON A. L. (12)
CHERASKIN E. (1)
CLARKE F. M. (273) (361) (362)
CLENDENON N. R. (250)
COON H. G. (396)
CORNELIUS C. E. (95)
COSTILL D. L. (216)
COTARIU D. (337)
COTMAN C. W. (364)
COX C. G. (146)
CRABTREE B. (292)
CREWS E. L. (172)
CRITZ J. B. (97) (108)
CULP L. A. (246)
CUNNINGHAM D. A. (134)
CUTINELLI L. (182)
DANDRIFOSSE G. (234)
DANIEL A.M. (242)
DAWSON D. M. (233)
DE LANNE R. (18)
DELFORGE E. (31)

- DE LUCA H. F. (338)
DEPOCAS F. (304)
DHALLA N. S. (287)
DIAMANT B. (78)
DIETER M. P. (64) (178) (179)
DODD G. H. (356)
DOERY J. C. (348)
DOLEZEL J. (48)
DOTY D. M. (288)
DUBACH U. C. (147)
DUCHENE-MARULLAZ P. (206) (207) (208)
DUJOVNE C. A. (239)
DULANEY J. T. (384)
DUPERRAY B. (76)
DYBKAER R. (5)
EATON J. W. (215)
EDWARDS B. A. (265)
ELGER J. (168)
ENGLHARDT A. (144)
ERMINI M. (285) (293)
ESTRADA O. S. (249)
FALHOLT K. (323)
FASSLER B. (401)
FELIG P. (85)
FELL H. B. (193)
FEUVRAY D. (221)
FINEAN J. B. (358)
FISCHER A. (195)
FISHBEIN W. N. (248)
FITZGERALD O. (45)
FLEISHER G. A. (268)
FORICHON J. (197)
FOWLER W. M. (125) (109)
FREUND H. (204) (205)
FRIEDEL R. (149) (150) (245)
FUGE K. W. (299)
GALE J. B. (161)
GALTEAU M. M. (275)
GAMBINO S. R. (14)
GARBUS J. (52)
GARDNER G. W. (110)
GEORGE W. K. (20)
GERLACH U. (142)
GIBBONS J. (367)
GITELMAN M. J. (6)
GODSE D. D. (198)
GOLDBERG D. M. (59)
GOLLNICK P. D. (282) (305) (237) (316)
GOSLING R. (403)
GOUBERN M. (262)
GOULD M. K. (279)
GRANGAUD R. (173)
GRANT N. H. (256)
GREEN D. E. (372)
GRIFFITHS P. D. (111)
GRIFFITHS W. J. (214)
GROFF W. A. (201)
GROSS W. O. (390)
GRUNDMANN R. (266)
GUISARD D. (203)
GURPIDE E. (238)
HAGEN I. (244)
HALLAUER W. (55)
HALONEN P. J. (112)
HAMBERGER A. (33)
HANSTEIN W. G. (378)
HARALAMBIE G. (26) (27) (54) (70) (127) (219)

- HATEFI Y. (377)
HAUNG Y. L. (395)
HAUSS W. H. (189)
HAWIGER J. (252)
HEARN G. R. (278) (280) (319)
HEINZ F. (341)
HENNY J. (87)
HEROUX O. (177) (301)
HIGASHINO K. (263)
HIGHMAN B. (71) (143)
HINZ R. W. (393)
HOLLMANN W. (86)
HOLLOSZY J. O. (163) (165) (289)
HOSICK H. L. (391)
HOUPERT Y. (400)
HOWARD R. B. (394)
HOWARTH R. E. (298)
HUDGSON P. (2)
HULTMAN E. (314)
HUNTER J. B. (65)
HURTER R. (46)
JAMES K. A. C. (359)
JEFFRESS R. N. (88)
JOYE H. (30)
KACHADORIAN W. A. (56)
KALDOR J. (397)
KARLSSON B. W. (240)
KENDRICK-JONES J. (94)
KEPPLER D. (77)
KEUL J. (66) (80)
KILBOM A. (62)
KIM M. S. (324)
KLEINE T. O. (190)
KLUGE A. (137)
KNOX W. E. (294) (325)
KORMENDY L. (340)
KOWALSKI K. (315)
KRAMAR R. (370)
KRAML M. (7)
KRAUS H. (69)
KRONER H. (399)
KRUSE-JARRES J. D. (199)
KUBISZ P. (148)
KUSTNER W. (113)
LABAT J. (159)
LAMB D. R. (90)
LANGSLET A. (222)
LATNER A. L. (160)
LAUDAHN G. (269)
LEIRIS J. De (188) (202) (225)
LENAZ G. (353)
LERNER S. S. (373)
LEVINE J. (10)
LOEGERING D. J. (194)
LOWRY O. H. (332)
MAC ARDLE B. (236)
MAC FARLAND B. M. (379)
MAC KECHNIE J. K. (114)
MAC LEAN A. E. M. (170)
MALBICA J. O. (255) (258)
MAMELI L. (352)
MARSH W. H. (11)
MASTERS C. J. (296)
MATTSON F. H. (50)
MATTISSON A. G. M. (368)
MELTZER H. (183)
METIVIER G. (22)
MOLE P. A. (164) (318)
MOORE S. (83)
MORGAN E. T. (312)

- MORGENSTERN S. (129) (130)
MORTON R. K. (349)
MOSCONA A. (386)
MOSER H. (3)
MUNOZ E. (376)
MUSSER A. W. (13)
MUSTAFA S. J. (384)
NAGLE F. (81)
NERDRUM H. J. (4)
NIKKILA E. A. (42)
NISHI H. H. (8)
NOLTE J. (329)
NOVOSADOVA J. (100)
NUTTALL F. Q. (218)
OHISHI I. (267)
OPHER A. W. (339)
OPIE L. H. (327)
OREVI M. (295)
OSCAI L. B. (68) (290) (321)
OSEID S. (41)
OTTO P. (115)
PANEK E. (330) (363)
PAPADOPOULOS N. M. (102) (103)
PAUL J. (385)
PENHOET E. (334) (336)
PERSIDSKY M. D. (254)
PETAJAN J. H. (180)
PETER J. B. (89)
PETTE D. (283)
PHILIPPOT J. (383)
PLOMTEUX G. (186)
POORTMANS J. R. (28) (29) (32)
(84) (116) (309)
PROCHAZKA B. (344)
PRUETT E. D. R. (21) (38)
RAAB W. (158) (274)
RAWLINSON W. A. (281)
REED A. H. (61)
REID E. (355)
REINDORP S. (171)
REITMAN J. (36)
REMMERS A. R. (117)
RENSING U. (335)
REYNOLDS J. A. (375)
RICHTERICH R. (34)
RINALDINI L. M. J. (387)
ROCHE M. (35)
RODBELL M. (392)
ROELOFSEN B. (354)
ROODYN D. B. (351)
ROOS F. (210) (209)
ROSE L. T. (118) (119)
ROSENTHAL S. (251)
ROUGIER G. (19) (93)
ROWELL L. B. (157)
RUFF F. (196)
RUSSELL W. E. (374)
SALTIN B. (217)
SANGSTER J. F. (99)
SANNERSTEDT R. (47)
SCARIA K. S. (302)
SCHEVING L. E. (141)
SCHLANG H. A. (120)
SCHMIDT E. (140) (154) (167)
(151) (347) (398)
SCHMIDT M. (57)
SCHRAMM M. (145)
SCHWARTZ D. (17)
SCHWARTZ P. L. (82) (121)
SEEMAN P. (241)

- SELYE H. (261)
SENAY L. C. (184)
SERBAN M. (271) (291) (286)
SHARMAN I. M. (176)
SHORT F. A. (313)
SIBLEY J. A. (169)
SIEST G. (15) (132) (211) (345)
 (16) (276) (277)
SIMON R. G. (303)
SOLVONUK P. F. (212)
SMITH R. E. (153)
SOTTOCASA G. L. (380)
STACHE S. (220)
STEIN P. (213)
STEINHAUS A. H. (63)
SUTTON J. R. (37)
SWAIMAN K. F. (122)
SZEGO C. M. (259)
TAUCHI H. (297)
TERJUNG R. L. (306) (307)
TERROINE Th. (300)
THARP G. D. (166)
THORLING E. B. (343)
TONNELAT J. (346)
TOPI G. C. (40) (123)
TRIGAUX J. P. (260)
VAINIO H. (264)
VAN CANEGHEM P. (257)
VANROUX R. (79)
VEJJAJIVA A. (126)
VERGNES H. (322)
VESELL E. S. (369) (136)
VORBURGER C. (402)
WADE O. L. (156)
WAGNER J. A. (187)
WAINIO W. W. (350)
WEISSMANN G. (243)
WERNER M. (60)
WIELAND T. (342)
WILLIAMS R. J. P. (371)
WOLLENBERGER A. (223)
WOODIN A. M. (272)
WRIGHT P. H. (43)
WRIGHT N. (191)
WRIGHT D. L. (382)
YAKOVLEV N. N. (311)
YOUNGNER J. S. (389)
ZIERLER K. L. (226) (227) (228)
 (229) (230) (231)
 (232)

----- TABLE DES MATIERES -----

TABLE DES MATIERES

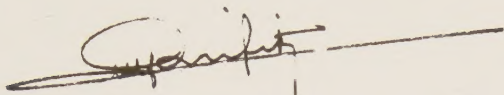
INTRODUCTION	p	1
PREMIERE PARTIE		
1 - <u>VARIATIONS DE PARAMETRES PLASMATIQUES APRES UN EFFORT STANDARDISE CHEZ LE SUJET NON ENTRAINE ET SUPPOSE SAIN</u>	p	5
1.1. MATERIEL ET METHODES	p	6
1.1.1. Définition de la population	p	6
1.1.2. Définition de l'épreuve d'effort	p	7
1.1.3. Prélèvements	p	7
1.1.4. Méthodes analytiques	p	9
1.2. RESULTATS ET DISCUSSION	p	9
1.2.1. Résultats globaux	p	9
1.2.1.1. Electrolytes et protéines	p	11
1.2.1.2. Substrats	p	14
1.2.1.3. Produits du catabolisme	p	16
1.2.2. Variations inter et intra individuelles de la réponse à l'effort	p	17
1.2.2.1. Influence du sexe	p	18
1.2.2.2. Influence de l'âge	p	18
1.2.2.3. Influence de l'entraînement et de l'activité physique	p	18
1.2.2.4. Influence du poids	p	19
2 - <u>VARIATIONS DES PARAMETRES PLASMATIQUES ET SANGUINS APRES UN EFFORT STANDARDISE CHEZ LE SPORTIF - COMPARAISON A UNE POPULATION NON ENTRAINEE</u>	p	20
2.1. MATERIEL ET METHODES	p	20
2.1.1. Définition de la population	p	20
2.1.2. Définition de l'épreuve d'effort	p	22
2.1.3. Prélèvements	p	22
2.1.4. Méthodes analytiques	p	22
2.2. RESULTATS ET DISCUSSION	p	22
2.2.1. Comparaison des valeurs obtenues chez les sportifs et les sujets non entraînés	p	24
2.2.1.1. Electrolytes et protéines	p	24
2.2.1.2. Produits du catabolisme	p	26
2.2.2. Examens spéciaux effectués chez les sportifs	p	28
2.2.2.1. Substrats et métabolites	p	28
2.2.2.2. Paramètres sanguins	p	31

3.-	<u>VARIATIONS DES ENZYMES PLASMATIQUES AU COURS DE L'EXERCICE</u>	p 35
3.1.	VARIATIONS DES ENZYMES PLASMATIQUES	p 35
3.1.1.	Chez les animaux	p 35
3.1.2.	Chez l'homme	p 39
3.2.	EXPERIMENTATION PERSONNELLE	p 41
3.2.1.	Matériel et méthodes	p 41
3.2.1.1.	Choix des populations, des épreuves d'effort	p 41
3.2.1.2.	Méthodes analytiques utilisées	p 41
3.2.1.3.	Expression des résultats	p 42
3.2.1.4.	Reproductibilité	p 42
3.2.2.	Résultats	p 43
3.2.2.1.	Dans la population non entraînée	p 43
3.2.2.2.	Population entraînée	p 46
3.2.3.	Discussion	p 47
4 -	<u>MESURE EN CONTINU IN "VIVO" DES VARIATIONS DE LA CPK AU COURS D'UNE EPREUVE D'EFFORT</u>	p 55
4.1.	MATERIEL ET METHODES	p 57
4.1.1.	Choix des sujets	p 57
4.1.2.	Epreuve d'effort	p 57
4.1.3.	Prélèvement	p 57
4.1.4.	Méthodes analytiques	p 57
4.2.	RESULTATS ET DISCUSSION	p 64
4.2.1.	Variations de l'acide lactique	p 64
4.2.2.	Variations de la CPK	p 65
	DEUXIEME PARTIE	p 69
5 -	<u>VALEURS DE REFERENCE DES ENZYMES ET ISOENZYMES DU MUSCLE GASTROCNEMIEN DE RAT</u>	p 75
5.1.	LES ENZYMES MUSCULAIRES CHEZ LE RAT : CONTENU ET VARIATIONS INTER ET INTRA INDIVIDUELLES	p 75
5.1.1.	Sexe	p 76
5.1.2.	Age	p 76
5.1.3.	Nutrition	p 76
5.1.4.	Vitamines	p 76
5.1.5.	Froid	p 76
5.1.6.	Effort, entraînement, activités physiques	p 77

5.1.6.1. Effet d'un exercice isolé	p 77
5.1.6.2. Adaptation à l'entraînement	p 78
5.1.7. Anoxie, hypoxie, altitude	p 79
5.1.8. Hormones	p 79
5.1.9. Toxiques - Médicaments	p 79
5.2. ESSAIS PERSONNELS	p 80
5.2.1. Matériel et méthodes	p 80
5.2.1.1. Méthodes analytiques	p 80
5.2.1.2. Matériel biologique	p 81
5.2.1.3. Préparation des broyats	p 81
5.2.2. Résultats et discussion	p 85
6 - " <u>DECROCHEMENT</u> ", EXTRACTION ET " <u>SOLUBILISATION</u> " DES ENZYMES. ACTION DE <u>DIFFERENTS FACTEURS</u>	p 90
6.1. MATERIEL ET METHODES	p 91
6.2. RESULTATS ET DISCUSSION	p 91
6.2.1. Influence du pH	p 91
6.2.2. Influence de la force ionique	p 93
6.2.3. Influence de la nature des ions	p 95
6.2.4. Effet des substrats spécifiques, des métabolites	p 99
6.2.5. Influence des détergents et des composés apparentés	p 102
7 - <u>SORTIE DES ENZYMES DE CELLULES MUSCULAIRES ISOLEES MAINTENUES EN SURVIE...</u>	p 105
7.1. ETAT MORPHOLOGIQUE ET VIABILITE DES CELLULES	p 105
7.1.1. Examen microscopique	p 105
7.1.2. Perméabilité au bleu trypan	p 106
7.1.3. Respiration des cellules	p 106
7.2. ISOLEMENT DES CELLULES A PARTIR DE MUSCLE DE RAT ADULTE.....	p 106
7.2.1. "Peignage" du muscle	p 106
7.2.2. Traitement à la trypsine	p 107
7.2.3. Traitement à la collagenase	p 108
7.3. ETUDE DE LA LIBERATION DES ENZYMES	p 110
7.3.1. Mesures en flux continu	p 110
7.3.2. Mesures par prélèvements discontinus	p 113
7.3.2.1. Essais successifs	p 113
7.3.2.2. Essais parallèles	p 115

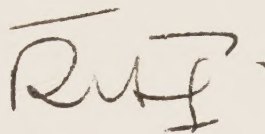
8 - SORTIE D'ENZYMES DU MUSCLE SQUELETTIQUE ENTIER ISOLE	p 111
8.1. MATERIEL ET METHODES	p 112
8.1.1. Prélèvement	p 118
8.1.2. Incubation	p 119
8.1.3. Broyage	p 119
8.1.4. Méthodes analytiques	p 119
8.1.5. Calculs	p 119
8.1.6. Vérification de la morphologie et contrôle de la survie	p 119
8.1.6.1. Microscopie électronique	p 119
8.1.6.2. Dosage du sodium et du potassium	p 121
8.2. RESULTATS ET DISCUSSION	p 121
8.2.1. Sortie d'enzymes des muscles-témoins	p 121
8.2.2. Influence des substrats et métabolites	p 122
8.2.2.1. Fructose 1-6 diphosphate	p 122
8.2.2.2. Créatine phosphate	p 126
8.2.2.3. Lactate de sodium	p 128
8.2.2.4. Glucose	p 131
8.2.3. Influence des détergents	p 132
8.2.4. Effet des médicaments	p 136
8.2.4.1. Biguanides hypoglycémiantes	p 138
8.2.4.2. Psycholeptiques	p 140
CONCLUSION GENERALE	p 144
BIBLIOGRAPHIE	p 149

VU
NANCY, le 20.9.73
Le Président de Thèse,

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'G. Benoit', written over a horizontal line.

VU et approuvé,
NANCY, le

Le Directeur de l'U.E.R. des
Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques de l'Université de NANCY I

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'R. Bene', written in a stylized, cursive manner.

R. BENE

NANCY, le 26 Septembre 1973
VU, le Président de
l'Université de NANCY I,

